

Metabolitenmuster im Blut und Genexpressionsmuster von Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-defizienten- und Wildtyp-Mäusen

vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

**Dissertation
(D386)**

vorgelegt von
Diplom-Chemiker

Thomas Michael Seibel

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk
23. Oktober 2014
Kaiserslautern

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.10.2014

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Esselen

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde zwischen Februar 2011 und Februar 2014 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit, meine fachlichen und persönlichen Fähigkeiten in seinem Arbeitskreis weiter zu entwickeln. Diese lehrreiche Zeit brachte nicht nur fachliches, sondern auch zwischenmenschliches Wissen.

Ein Dank gilt der Stiftung Innovation Rheinland-Pfalz für die finanzielle Unterstützung des Projektes und Herrn Dr. Werner Römisch-Margl vom Institut für Bioinformatik und Systembiologie (Arbeitskreis Dr. Gabi Kastenmüller, HelmholtzZentrum München) für die Hilfe bei der Bearbeitung der LC-MS *full scan*-Messungen.

Des Weiteren danke ich auch Anastasia, Kerstin, Dr. Alex, Lucas, Melanie, Dr. Chrissi, Dr. Helena, Melina, Eva, Rainer, Sabrina, Simone für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die lustigen Pausen im Kaffeezimmer. Es war eine sehr schöne Zeit mit euch. Ich werde sie vermissen.

Außerdem möchte ich mich beim IBWF bedanken, die mir, nach einem Defekt der PCR-Maschine des Arbeitskreises, ihre PCR-Maschine zur Verfügung gestellt haben. Sowie Herrn Dr. Karsten Andresen möchte ich danken für die Auswertung der Microarray-Analysen.

Vieles wird für selbstverständlich gehalten. Doch der größte Dank gebührt meiner Frau Sandra, die zu jeder erdenklichen Stunde für mich da war und mich moralisch unterstützte, auch wenn ich mal ein Nervenbündel war.

Ein weiterer Dank gebührt meinen Freunden Peter, Felix und Philip, die mir in meiner freien Zeit sowie den zahlreichen FCK-Spielen mit aufmunternden Gesprächen und reichlich Ablenkung zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern, die für mich in jeglicher Situation da waren. Sie begleiteten mich durch alle Etappen über Höhen und Tiefen und dafür danke ich ihnen sehr.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	v
Abstract.....	ix
Kurzzusammenfassung.....	xi
Abkürzungsverzeichnis.....	xiii
Abbildungsverzeichnis.....	xvii
Tabellenverzeichnis.....	xxi
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin.....	3
2.1.1 Allgemein.....	3
2.1.2 Physikalische und chemische Eigenschaften.....	4
2.1.3 Entstehung, Verwendung und Exposition.....	4
2.1.4 Toxikokinetik von TCDD.....	5
2.1.5 Metabolismus und Ausscheidung.....	6
2.1.6 Akute und chronische/subchronische Toxizität.....	7
2.1.7 Kanzerogenität und Tumorpromotion.....	8
2.2 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR).....	9
2.2.1 AhR-Signaltransduktion.....	10
2.2.2 Physiologische Rolle des AhR.....	12
2.2.3 AhR-Liganden.....	13
2.2.4 AhR-Knockout-Mäuse.....	16
2.3 Fremdstoffmetabolismus.....	17
2.3.1 Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen.....	18
2.4 Vitamin-D-Rezeptor.....	25
2.4.1 Vorkommen und Struktur.....	25
2.4.2 Signaltransduktion.....	26
2.4.3 VDR und VDR-Zielgene in Tumoren.....	28
2.5 Protoonkogen c-Myc.....	29
2.5.1 Regulation der Transkription.....	30
2.5.2 Struktur und funktionelle Domänen des c-Myc-Proteins.....	31
2.5.3 Signaltransduktion und c-Myc-Zielgene.....	32
3. Methoden.....	35

3.1. Zucht der Tiere	35
3.2 Genotypisierung der Mäuse.....	36
3.2.1 DNA-Isolierung	36
3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) der Maus-DNA	37
3.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	38
3.3 Behandlung der Tiere sowie Blut- und Organentnahme	40
3.4 Metabolomics	40
3.4.1 Hochleistungsflüssigchromatographie	41
3.4.2 UV/Vis- Spektroskopie.....	42
3.4.3 Massenspektrometrie	43
3.4.4 HPLC-MS/MS	43
3.4.5 Elektronensprayionisation (ESI).....	44
3.4.6 Quadrupol-Tandemmassenspektrometer	45
3.4.7 Aufarbeitung der Vollblutproben und Messung	46
3.5 Aufarbeitung der Gewebeproben.....	49
3.5.1 Mikrosomenpräparation.....	49
3.5.2 Herstellung des Zelllysats für Western Blot-Analysen.....	51
3.5.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay	51
3.5.4 mRNA-Isolierung aus Gewebe.....	53
3.5.5 Bestimmung der Konzentration und Qualität der RNA.....	54
3.6 Biomolekulare Arbeiten	56
3.6.1 Microarray	56
3.6.2 cDNA-Synthese	63
3.6.3 Real-Time PCR (RT-PCR).....	64
3.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	68
3.6.5 Western Blot und Immunoblot	70
3.6.7 Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase-Assay (EROD) nach Kennedy.....	75
3.7 Statistische Auswertung	80
4. Ergebnisse der Tierstudie	81
4.1 Genotypisierung	81
4.2 Behandlung der Tiere	82
4.3 Relative Leber- und Nierengewichte	83
4.3.1 Relative Lebergewichte	83
4.3.2 Relatives Nierengewicht	86
4.4 EROD-Assay in Leber, Niere, Lunge und Milz	89
4.4.1 Leber.....	89

4.4.2 Niere	91
4.4.3 Lunge.....	92
4.4.4 Milz	94
4.5 Western Blot in Leber, Niere, Lunge und Milz.....	95
4.5.1 Ah-Rezeptor in den Lebern	95
4.5.2 Cytochrom P450-Enzyme.....	97
4.6 Microarray.....	105
4.6.1 Microarray-Ergebnisse	105
4.6.2 TCDD-behandelte AhR-defiziente Mäuse.....	107
4.6.3 TCDD-behandelte AhR-Wildtyp-Mäuse.....	119
4.6.4 Vergleich der Microarray-Genexpressionsdaten	130
4.7 Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	135
4.7.1 Expression des <i>AhR</i> in Leber, Niere, Lunge und Milz.....	135
4.7.2 Expression der Cytochrom P450-Enzyme in Leber, Niere, Lunge und Milz	140
4.7.3 Genexpression der TopGO-Analyse in den Nieren	149
4.7.4 Genexpression der topGO-Analyse in den Lebern	155
4.7.5 Genexpression von <i>c-Myc</i> in Leber, Niere, Lunge und Milz.....	161
4.7.6 Genexpression der von <i>c-Myc</i> möglicherweise regulierten Gene	164
4.7.7 Genexpression von <i>Cyp24a1</i> , <i>Cyp27b1</i> und <i>VDR</i> in Leber und Niere.....	170
4.7.8 Genexpression verschiedener Zytokine in Leber und Milz	175
4.7.9 Genexpression von <i>Esm1</i> , <i>Igfbp1</i> und <i>Cdh1</i> in den Lebern.....	179
4.8 Metabolomics	182
4.8.1 Metabolic Fingerprinting: Vollblut.....	183
4.8.2 Metabolic profiling: Vollblut.....	187
4.9 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	195
4.9.1 EROD-Assay	197
4.9.2 Western-Blot.....	198
4.9.3 Genexpressionsanalysen (Microarray und RT-PCR).....	199
4.9.4 Metabolomics	208
5. Materialien	210
5.1 Chemikalienliste.....	210
5.2 Kits	213
5.3 Verbrauchsmaterialien.....	214
5.4 Geräteliste.....	215
6. Literaturverzeichnis.....	218
7. Anhang.....	240

7.1 Microarray.....	240
7.2 Metabolomics.....	263
Lebenslauf.....	266
Eidesstattliche Erklärung.....	268

Abstract

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins like 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxine (TCDD), which belong to the class of polyhalogenated aromatic hydrocarbons, are lipophilic and persistent environmental pollutants. They are generated as unwanted contaminants and by-products in chemical combustion processes for example waste and sewage sludge incinerations as well as in other chemical processes such as paper pulp bleaching or metal smelting. Due to their high persistence they accumulate in the feed and food chain. Dioxins evoke a broad spectrum of biochemical and toxicological effects like enzyme induction, hepatotoxicity, dermal toxicity, immunotoxicity and carcinogenicity. Adverse effects on reproduction, development, and the endocrine system have been demonstrated in numerous animal studies. Most, if not all, toxic effects of dioxins are mediated by the aryl-hydrocarbon-receptor (AhR). In the last decade AhR-independent TCDD-effects were observed in some studies. Only a few studies address the kidney as a target organ of TCDD, although the AhR seems to play an important role in kidney development. In the present work an animal study with AhR wild-type (AhR^{+/+}) and AhR-deficient (AhR^{-/-}) mice was performed. In this study female and male AhR^{+/+} and AhR^{-/-} mice were treated with a single dose of TCDD (25 µg/kg bw) by gavage. A microarray analysis of renal gene expression patterns was performed aiming to characterize AhR-dependent and AhR-independent TCDD-mediated effects in AhR wild-type and AhR-Knockout mice. As a result of this study, 172 genes were regulated in the kidney of wild-type mice and 325 genes in the kidney of AhR-deficient mice. TCDD-treatment of AhR^{-/-} mice resulted in upregulation of genes involved in processes of hematopoietic system, blood coagulation, biosynthesis of sterols and catabolism of organic acids and downregulation of genes involved in processes of lipid metabolism, biosynthesis and metabolism of small molecules as well as hormone metabolism. Increased expression of a few selected renal genes of the hematopoietic system (e.g. *Hba-a1*, *Hbb-b1* and *Rps14*), blood coagulation (e.g. *Fgg* and *F10*), as well as some hepatic genes such as *Lpl*, *Anxa1*, *c-Myc*, *Igfbp1*, *Esm1* and *Cdh1* (observed in earlier studies) were analyzed and confirmed by RT-PCR. In liver and spleen a slight and partly significant induction of some anti- and pro-inflammatory cytokines (*IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α*) was determined. Furthermore the induction of the xenobiotic metabolizing enzymes Cyp1a1, Cyp1a2 and Cyp1b1 in liver, kidney, lung and spleen of TCDD-treated AhR wild-type mice were analyzed and confirmed by western blot and RT-PCR. With one exception, in spleen of treated wild-type mice no induction was observed in RT-PCR. In livers of treated AhR^{-/-} mice, the *Cyp1b1*-expression was significantly increased while gene expression of *AhR* was decreased. The induction of the vitamin d-receptor (VDR) regulated genes *Cyp24a1*, *Cyp27b1* and *VDR* in kidneys of treated AhR-Knockout mice indicates an activation of VDR. Furthermore the additionally decreased *c-Myc*-expression in kidneys of treated AhR-deficient mice supports the proposed activation of VDR. Investigating the role of AhR in the metabolome, differences and similarities between AhR-deficient and

wild-type mice were determined by HPLC/MS-MS analysis of mouse whole blood of each genotype with and without TCDD-treatment. Differences in amino acid and tryptophan metabolism between AhR^{+/+} and AhR^{-/-} were observed.

Kurzzusammenfassung

Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), die zur Stoffgruppe der polyhalogenierten Kohlenwasserstoffe gehören, sind lipophile und persistente Umweltkontaminanten. Sie entstehen als unerwünschte Verunreinigungen bzw. Begleitstoffe vor allem während Verbrennungsprozessen organischer Materialien wie Holz oder Müll, im Tabakrauch sowie als Nebenprodukt chlororganischer Synthesen. Aufgrund ihrer hohen Lipophilie reichern sie sich in der Nahrungskette an. Dioxine wie TCDD verursachen eine Vielzahl von biochemischen und toxischen Effekten wie z.B. Enzym-Induktion, Lebertoxizität, dermale Toxizität, Immuntoxizität und Kanzerogenität. Im Tiermodell konnte eine Beeinträchtigung des Fortpflanzungssystems und des Hormonhaushaltes beobachtet werden. In der Literatur herrscht Einigkeit, dass die meisten wenn nicht sogar alle toxischen Wirkungen der Dioxine über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt werden. Im letzten Jahrzehnt konnten jedoch in mehreren Studien AhR-unabhängige TCDD-Wirkungen beobachtet werden. Nur wenige Studien befassen sich mit der Niere als Zielorgan, wobei belegt werden konnte, dass der AhR auch für die Entwicklung der Niere eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Tierstudie mit Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäusen durchgeführt und dabei auch die Niere als Zielorgan betrachtet. Zunächst wurden weibliche und männliche Wildtyp- und AhR-defiziente-Mäuse einmalig mit TCDD (25 µg/kg KG) oral behandelt. Anschließend wurden Genexpressionsmuster in den Nieren mittels Microarray analysiert. In den Nieren behandelter Wildtyp-Mäuse wiesen 172 Gene, und in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse wiesen 325 Gene eine veränderte Expression auf. In den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse wurden Gene hochreguliert, die in Prozesse des blutbildenden Systems, der Blutgerinnung sowie der Biosynthese von Sterolen und des Katabolismus von organischen Säuren involviert sind. Herunterreguliert wurden Gene, die in Prozesse des Lipidmetabolismus, der Biosynthese sowie des Metabolismus kleinerer Moleküle und des Metabolismus von Hormonen involviert sind. Mittels RT-PCR wurde die im Microarray beobachtete erhöhte Expression einiger ausgewählter Gene des blutbildenden Systems (z. B. *Hba-a1*, *Hbb-b1* und *Rps14*) und der Blutgerinnung (z. B. *Fgg* und *F10*) sowie einiger hepatischer Gene wie *Lpl*, *Anxa1*, *c-Myc*, *Igfbp1*, *Esm1* und *Cdh1* (Microarray-Analyse der Lebern wurde in einer früheren Studie gemessen) bestätigt. Des Weiteren wurde eine leichte, teilweise signifikant erhöhte Expression einiger pro- bzw. antiinflammatorischer Zytokine (*IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10* und *TNF-α*) in den Lebern und Milzen behandelter AhR-defizienter-Mäuse beobachtet. Die Induktion fremdstoffemtabolisierender Enzyme wie *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* in den Organen Leber, Niere, Lunge und Milz behandelter Wildtyp-Mäuse konnte mittels Western-Blot und RT-PCR bestätigt werden, jedoch mit einer Ausnahme. In den Milzen behandelter Wildtyp-Mäuse konnte keine Induktion dieser Enzyme auf mRNA-Ebene beobachtet werden. In den Lebern behandelter AhR-defizienter-Mäuse war die *Cyp1b1*-Expression signifikant erhöht sowie die *AhR*-Expression vermindert. Die Induktion der Vitamin D-Rezeptor (VDR)-

regulierten Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse weist auf die Aktivierung des VDR hin. Des Weiteren stellt die verminderte Expression von *c-Myc* in den Nieren TCDD-behandelter Knockout-Mäuse ein Hinweis für die Aktivierung des VDR dar. Durch HPLC/MS-MS-gestützte Untersuchung des Vollblutes von AhR-Wildtyp- und AhR-Knockout-Mäusen konnten Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Genotypen bestimmt werden. So war es möglich Unterschiede im Aminosäuremetabolismus sowie im Tryptophan-Metabolismus zu identifizieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl im unbehandelten wie auch im TCDD-behandelten Zustand, Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden.

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
A	colour intensity
Afp	α -Fetoprotein
AhR	Aryl-Hydrcarbon-Rezeptor
AhR ^{+/+}	Wildtyp
AhR ^{-/-}	Knockout (AhR-defizient)
AhR-Knockout	Knockout (AhR-defizient)
AhRR	Aryl-Hydrcarbon-Rezeptor Repressor
AhR-Wildtyp	Wildtyp
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
amu	atomic mass unit
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	aryl-hydrocarbon nuclear translokator
Asns	Asparagin-Synthetase
BCA	Bicinchoninsäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bHLH/PAS	basic helix-loop-helix per-ARNT-Sim
BR	basische Region
BSA	Bovine Serum Albumine
bw	body weight
Ca ²⁺	Calcium(II)-Ionen
CAR	constitutive androstane receptor
CCRP	Cytoplasmic CAR Retention Protein
cDNA	komplementäre DNA
Cdh1	Cadherin1
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
cRNA	komplementäre RNA
C _T	Cyle Threshold
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
COX	Cyclooxygenasen
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddH ₂ O	bidestiliertes Wasser
DEN	Diethylnitrosamin
DL	doxin-ähnlich
DMBA	7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRE	dioxin-responsive element
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
e.g.	[<i>exempli gratia</i>] for example
EGTA	bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER α	Östrogen-Rezeptor
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
ESI	Elektronensprayionisation

Esm1	endothelial cell specific molecule 1
F10	coagulation factor X
FDR	false discovery rate
Fe ³⁺	Eisen(III)-Ionen
Fgb	Fibrinogen beta chain
Fgg	Fibrinogen gamma chain
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
for	forward
g	Gramm
g	mittlere Erdbeschleunigung
GC-Gehalt	Guanidin- und Cytosin-Gehalt
GO	gene ontology
GSK-3	Glycogensynthasekinase-3
h	human
h	Stunde
HCC	(hepatozelluläres) Leberzellkarzinom
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Hsd	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Hsp	Hitzeschockprotein
I3C	Indol-3-carbazol
ICZ	Indol[3,2- <i>b</i>]carbazol
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LBD	Ligandenbindungsdomäne
lfc	logarithmic (base 2) fold change / log ₂ fc
LOAEL	lowest observed adverse effect level
m	mouse
M	Molar
MAD	Max dimerization protein
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAX	Myc-associated factor-X
MeOH	Methanol
mg	Miligramm
min	Minute
Miz-1	Myc interacting zinc finger protein 1
ml	Mililiter
μl	Mikroliter
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MT	Methyltransferasen
n	Anzahl der unabhängigen Experimente
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NAT	Aminoacyltransferasen

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	Kernexport-Sequenz
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssequenz
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP	Normalphase
NTP	United States National Toxicology Program
NTP	Nukleosidtriphosphat
p / p-Wert	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Phenobarbital
PBREM	PB responsive enhancer module
PBS	phosphate buffered saline
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
PCDDs	Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDFs	Polychlorierte Dibenzofurane
PCR	Polymerase Chain Reaktion/Polymerase-Kettenreaktion
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pM	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
ppt	parts per trillion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXR	pregnane X receptor
qRT-PCR/ RT-PCR	quantitative PCR/Real-Time PCR
Ras	rat sarcoma
Raf	rat fibrosarcoma
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive Sauerstoffspezies
RP	reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Real-Time
RXR	retinoid X rezeptor
SCF	Scientific Committee on Food
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
Serpinc1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade C, Member 1
siRNA	small interfering RNA
SMAD	Sma (small body size) und MAD (mothers against decapentaplegic)
STAT	signal transducers and activators of transcription
SULT	Sulfotransferase
TAE	tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodib- <i>p</i> -dioxin
TDI	tolerable daily intake
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEQ	Toxizitätsäquivalent

TIC	total ion current
TNF	tumor necrosis factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
TRRAP	transformation/transcription-domain-associated protein
TDI	tolerable weekly intake
UGT	UDP Glucuronosyltransferase
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
VDR	Vitamin D-Rezeptor
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp
Wnt	wingless/int-1
XAP	Hepatitis Virus X-assoziertes Protein
XIC	extracted ion chromatogram
XRE	xenobiotic responsive element
XREM	xenobiotic responsive enhancer module

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von TCDD.....	3
Abbildung 2: Formel zur Berechnung des TEQ	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des murinen AhR-Proteins (nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007)	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der AhR Signaltransduktion (nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007)	11
Abbildung 5: Strukturformeln einiger Gruppen polyhalogener/polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.....	14
Abbildung 6: Strukturformel von FICZ, Kynurenin, Prostaglandin G2 und Indolo[3,2-b]carbazol.....	15
Abbildung 7: Bruttogleichung der Monooxygenase-Reaktion (nach Eisenbrand <i>et al.</i> 2005).....	19
Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des mehrstufigen Mechanismus der Monooxygenierung von Fremdstoffen durch Cytochrom P450-Enzyme (nach Eisenbrand <i>et al.</i> 2005).....	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung der AhR-Signaltransduktion (nach Denison <i>et al.</i> 2011).....	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung der indirekten Aktivierung von CAR durch einen Aktivator oder der direkten Aktivierung durch einen Liganden (nach Kawamoto <i>et al.</i> 1999, Moore <i>et al.</i> 2000, Swales und Negishi 2004, Timsit und Negishi 2007).....	23
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aktivierung von PXR durch Rifampicin (nach Goodwin <i>et al.</i> 2002, Timsit und Negishi 2007)	24
Abbildung 12: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des VDR (nach Issa <i>et al.</i> 1998)	26
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Aktivierung des VDR durch Calcitriol (nach Issa <i>et al.</i> 1998, Rachez und Freedman 2000)	27
Abbildung 14: Regulation der <i>c-Myc</i> -Transkription und posttranslationale Modifikation (nach Sears <i>et al.</i> 2000, Meyer und Penn 2008).....	30
Abbildung 15: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des <i>c-Myc</i> -Proteins (nach Meyer und Penn 2008).....	31
Abbildung 16: <i>c-Myc</i> als Regulator der Transkription und das <i>Myc</i> /max/Mad-Netzwerk (nach Grandori <i>et al.</i> 2000, Baudino und Cleveland 2001, Patel <i>et al.</i> 2004, Meyer und Penn 2008).....	33
Abbildung 17: Fließschema des DNA-Isolationsprotokolls (Omega Bio-Tek, 2013)	36
Abbildung 18: Schematischer Aufbau eine HPLC-Anlage (Cammann 2001).....	42
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation (AB Sciex 2008)	44
Abbildung 20: Schematische Darstellung eines Quadrupolmassenfilters mit stabilen und instabilen Ionenbahnen (Cammann 2001).....	45
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometers (AB Sciex 2010)	46
Abbildung 22: Schematische Darstellung des Produktionenscans (AB Sciex2008).....	46
Abbildung 23: Formel der Volumenkorrektur	47
Abbildung 24 : Strukturformel von Bicinchoninsäure (BCA).....	52
Abbildung 25: Chelatbildung eines Cu^+ und zwei Molekülen Bicinchoninsäure (nach Pierce 2010).....	52
Abbildung 26: Fließschema der RNA-Isolationsmethode mit dem RNeasy Kit (Qiagen, 2010)	54
Abbildung 27: Zusammengefasste Versuchsdurchführung für die Überprüfung der RNA-Qualität und -Konzentration mittels Bioanalyser.....	55
Abbildung 28: Beispiel für ein Elektropherogramm und das Gelfoto; RNA von der Niere einer behandelten AhR-defizienten Maus	56
Abbildung 29: Schematische Darstellung der Microarray Versuchsdurchführung	57

Abbildung 30: Schematischer Aufbau des semi-dry blotting-Stapels.....	71
Abbildung 31: Chemolumineszenzreaktion.....	73
Abbildung 32: Umsetzung von Ethoxyresorufin zu Resorufin.....	75
Abbildung 33: Formel zur Berechnung der EROD-Aktivität.....	77
Abbildung 34: Foto einer entbluteten Leber einer fünf Monate alten AhR-defizienten Maus (links) im Vergleich zu einer Leber einer fünf Monate alten AhR-Wildtyp-Maus (rechts).....	84
Abbildung 35: Relatives mittleres Lebergewicht männlicher Mäuse.....	85
Abbildung 36: Vergleich des relativen mittleren Lebergewichtes von männlichen und weiblichen Mäusen.....	86
Abbildung 37: Relatives mittleres Nierengewicht weiblicher Mäuse.....	87
Abbildung 38: Relatives mittleres Nierengewicht männlicher Mäuse.....	88
Abbildung 39: Vergleich der relativen Nierengewichte weiblicher und männlicher Mäuse.....	89
Abbildung 40: EROD-Aktivität in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse.....	90
Abbildung 41: EROD-Aktivitäten in den Nieren weiblicher und männlicher Mäuse.....	92
Abbildung 42: EROD-Aktivität in den Lungen weiblicher und männlicher Mäuse.....	93
Abbildung 43: EROD-Aktivität in den Milzen weiblicher und männlicher Mäuse.....	94
Abbildung 44: Western Blots des Ah-Rezeptors in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse.....	96
Abbildung 45: Schematische Darstellung des murinen AhR-Proteins mit Bindung des Antikörpers (modifiziert nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007).....	97
Abbildung 46: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lebern weiblicher Mäuse.....	98
Abbildung 47: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lebern männlicher Mäuse.....	99
Abbildung 48: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Nieren weiblicher Mäuse.....	100
Abbildung 49: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Nieren männlicher Mäuse.....	101
Abbildung 50: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lungen weiblicher Mäuse.....	102
Abbildung 51: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1A2 und Cyp1B1 in den Lungen männlicher Mäuse.....	102
Abbildung 52: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Milzen weiblicher Mäuse.....	103
Abbildung 53: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Milzen männlicher Mäuse.....	104
Abbildung 54: Anzahl der hoch- und runterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR ^{+/+} - und AhR ^{-/-} -Mäuse.....	106
Abbildung 55: Heatmap ausgewählter Gene aus den Microarray-Daten der Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout- und AhR-Wildtyp-Mäuse.....	107
Abbildung 56: Prozess erythrocyte homeostasis und damit verbundene Prozesse in einem gerichteten azyklischen GO-Teilgraph zusammengefasst dargestellt.....	112
Abbildung 57: Azyklisch gerichteter GO-Teilgraph einiger GO terms, die in Verbindung miteinander stehen.....	113
Abbildung 58: Prozess organic acid catabolic process in einem gerichteten azyklischen GO-Teilgraph zusammengefasst dargestellt.....	114
Abbildung 59: Herrunterregulierte Prozesse in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse in einem gerichteten azyklischen GO-Teilgraph zusammengefasst dargestellt.....	115
Abbildung 60: Gerichteter azyklischer GO-Teilgraph hochregulierter Prozesse in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse.....	122
Abbildung 61: Gerichteter azyklischer GO-Teilgraph für die beiden GO terms brown fat cell differentiation (GO:0050873) und fat cell differentiation (GO:0045444.....	123
Abbildung 62: Gerichteter azyklischer GO-Teilgraph für die restlichen hochregulierten GO terms in den Nieren behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse.....	125
Abbildung 63: Anzahl der regulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäuse.....	130
Abbildung 64: Vergleich der Anzahl der unterschiedlich regulierten Gene in den Nieren weiblicher TCDD behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse.....	130

Abbildung 65: Genexpression (RT-PCR) des AhR in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse	136
Abbildung 66: Genexpression (RT-PCR) des AhR in den Nieren weiblicher und männlicher Mäuse.....	137
Abbildung 67: Genexpression (RT-PCR) des AhR in den Lungen weiblicher und männlicher Mäuse	139
Abbildung 68: Genexpression (RT-PCR) des AhR in den Milzen weiblicher und männlicher Mäuse	140
Abbildung 69: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	142
Abbildung 70: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	144
Abbildung 71: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Lungen A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	147
Abbildung 72: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Milzen weiblicher Mäuse	148
Abbildung 73: Genexpression (RT-PCR) von <i>Serpinc1</i> , <i>Fgg</i> , <i>Fgb</i> und <i>F10</i> in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	150
Abbildung 74: Genexpression (RT-PCR) von <i>Hba-a1</i> , <i>Hba-a2</i> , <i>Hbb-b1</i> , <i>Hbb-b2</i> und <i>Rps14</i> in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	153
Abbildung 75: Genexpression (RT-PCR) von <i>Tdo2</i> in den Nieren weiblicher und männlicher Mäuse	154
Abbildung 76: Genexpression (RT-PCR) von <i>Hba-a2</i> , <i>Hbb-b1</i> und <i>Hbb-b2</i> in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	157
Abbildung 77: Genexpression (RT-PCR) von <i>Lpl</i> in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse.....	158
Abbildung 78: Genexpression (RT-PCR) von <i>Anxa1</i> und <i>Pla2g4a</i> in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse.....	160
Abbildung 79: Expression (RT-PCR) von c-Myc in den unterschiedlichen Organen A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	163
Abbildung 80: Expression (RT-PCR) der mit c-Myc in Verbindung stehenden Gene in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	166
Abbildung 81: Expression (RT-PCR) der mit c-Myc in Verbindung stehenden Gene in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse	169
Abbildung 82: Genexpression (RT-PCR) von <i>Cyp24a1</i> , <i>Cyp27b1</i> und <i>VDR</i> in den Lebern und Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse	172
Abbildung 83: Expression (RT-PCR) verschiedener Zytokine in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	176
Abbildung 84: Expression verschiedener Cytokine in den Milzen der weiblichen Mäuse.....	179
Abbildung 85: Expression der Gene <i>Esm1</i> , <i>Igfbp1</i> und <i>Cdh1</i> in Leber A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse.....	181
Abbildung 86: HPLC-UV-Chromatogramm einer Vollblut-Probe einer AhR-Wildtyp Kontrolle.....	183
Abbildung 87: Beispiel für die Identifizierung eines Metaboliten im Vollblut; AhR-Knockout TCDD-behandelt; Obere Darstellung: HPLC-UV-Chromatogramm bei einer Messwellenlänge von 260 nm;; Mittlere Darstellung: extracted ion chromatogram (XIC) bei einem m/z-Verhältnis von 177,3; Untere Darstellung: Q1-Scan der m/z-Verhältnisse des im UV-Chromatogramm ausgewählten Peaks im Elutionsbereich von 10,4–11,4 min.	184
Abbildung 88: Fragmentierungsmuster des Massesignals von 177,3 m/z aus AhR-Knockout	185
TCDD-behandelt; product ion scan;	185
Abbildung 89: Obere Darstellung: Fragmentierungsmuster der Reinsubstanz Serotonin; t-R: 10,9- 11,8 product ion scan; Kollisionsenergie (CE) 25 eV;	186
Untere Darstellung: XIC der Reinsubstanz Serotonin (177.3 m/z).....	186
Abbildung 90: HPLC-UV-Chromatogramme; Vergleich von Vollblutproben der unbehandelten, weiblichen Kontrollmäuse.....	188

Abbildung 91: HPLC-UV-Chromatogramme (Vollblut); Vergleich Wildtyp-Kontrolle (blau) mit TCDD-behandeltem Wildtyp (rot).....	189
Abbildung 92: HPLC-UV-Chromatogramme (Vollblut); Vergleich AhR-Knockout-Kontrolle (blau) mit TCDD-behandelter AhR-Knockout Maus (rot)	190
Abbildung 93: HPLC-UV-Chromatogramme (Vollblut); Vergleich TCDD-behandelter Wildtyp (rot) mit TCDD-behandeltem AhR-Knockout (blau)	191
Abbildung 94: Vergleich der EROD-Aktivitäten weiblicher und männlicher Tiere und verschiedener Organe	198

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Konstrukt Details	35
Tabelle 2:	PCR-Ansatz für Maus Genotypisierung.....	37
Tabelle 3:	PCR-Programm (MyCycler Protocol) für Maus Genotypisierung	38
Tabelle 4:	Für DNA-Agarose Gelelektrophorese verwendete Puffer	39
Tabelle 5:	Zusammensetzung des 1.5% Agarose/ 0.02% Ethidiumbromid Gels.....	39
Tabelle 6:	Anzahl der Tiere pro Geschlecht, deren Genotyp und die Behandlung.....	40
Tabelle 7:	Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung des Vollblut mittels Chromabond HR-X (200 mg/3 ml).....	47
Tabelle 8:	Parameter des HPLC-Läufe (HPLC Perkin Elmer)	48
Tabelle 9:	Einstellungen des Massspektrometers (API2000, AB Sciex)	49
Tabelle 10:	Zusammensetzung des <i>5 x isotonic extraction buffer (IEB)</i>	50
Tabelle 11:	Zusammensetzung <i>1 x IEB</i>	50
Tabelle 12:	Zusammensetzung NaPi-Puffers.....	50
Tabelle 13:	Zusammensetzung des Lysispuffers für die Western Blot-Analyse.....	51
Tabelle 14:	Pipettierschema der BSA-Eichgeraden	53
Tabelle 15:	Verdünnung der <i>Spike-In Mix A</i> und <i>B</i> Lösungen.....	58
Tabelle 16:	<i>T7 Promotor Primer Mix</i> pro Reaktion.....	59
Tabelle 17:	<i>cDNA Master Mix</i>	59
Tabelle 18:	<i>Transcription Master Mix</i>	60
Tabelle 19:	<i>Fragmentation Mix</i>	62
Tabelle 20:	Temperaturprogramm cDNA-Synthese	63
Tabelle 21:	Temperaturprogramm der RT-PCR	65
Tabelle 22:	RT-PCR Reaktionsansatz.....	65
Tabelle 23:	Verwendete Primer für RT-PCR.....	66
Tabelle 24:	Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE.....	69
Tabelle 25:	Zusammensetzung <i>6 x Loading-Buffer</i>	70
Tabelle 26:	Im Immunoblot eingesetzte Antikörper	72
Tabelle 27:	Zusammensetzung 20x TBS	72
Tabelle 28:	Zusammensetzung 0,1 % TBS-T	72
Tabelle 29:	Zusammensetzung Chemilumineszenz-Detektionsreagenz	73
Tabelle 30:	Zusammensetzung Lösung A und B	74
Tabelle 31:	Zusammensetzung <i>p-Coumarinsäure</i>	74
Tabelle 32:	Zusammensetzung Stripping-Puffer	75
Tabelle 33:	Pipettierschema für Standardreihenplatte	76
Tabelle 34:	Protein- und Resorufingehalte pro Well der Standardreihen	77
Tabelle 35:	Zusammensetzung der Ethoxyresorufin Stammlösung.....	77
Tabelle 36:	Zusammensetzung der Fluorescamin-Stop-Lösung Stammlösung	77
Tabelle 37:	Zusammensetzung der Resorufin-Kalibrierlösung Stammlösung.....	78
Tabelle 38:	Zusammensetzung der Fluorescamin-Stop-Lösung (Arbeitslösung)	78
Tabelle 39:	Zusammensetzung der Ethoxyresorufin (Arbeitslösung).....	78
Tabelle 40:	Zusammensetzung NaPi-Puffer	78
Tabelle 41:	Zusammensetzung NADPH-Lösung.....	79
Tabelle 42:	Zusammensetzung BSA-Kalibrierlösung.....	79
Tabelle 43:	Zusammensetzung Resorufin Kalibrierlösung	79
Tabelle 44:	Genotypisierungsergebnisse der verwendeten weiblichen Tiere;	81
Tabelle 45:	Genotypisierungsergebnisse der verwendeten männlichen Tiere;	82

Tabelle 46:	Die Anzahl der Tiere pro Geschlecht, deren Genotyp und die Behandlung	83
Tabelle 47:	Liste der zehn am stärksten hoch-und herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter Mäuse.....	111
Tabelle 48:	<i>Gene Ontology (GO)</i> -Analyse der hochregulierten Gene in den Nieren behandelte AhR-Knockout-Tiere.....	116
Tabelle 49:	<i>Gene Ontology (GO)</i> -Analyse der herunterregulierten Gene in den Nieren behandelte AhR-Knockout-Tiere.....	117
Tabelle 50:	Liste der zehn am stärksten hoch-und herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse	116
Tabelle 51:	<i>Gene Ontology (GO)</i> -Analyse der hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse	117
Tabelle 52:	<i>Gene Ontology (GO)</i> -Analyse der herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse	119
Tabelle 53:	Genexpressionsdaten aus dem Microarray für die Gene <i>Hba-a1</i> , <i>Hba-a2</i> , <i>Hbb-b1</i> , <i>Hbb-b2</i> und <i>Rps14</i> in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse.....	121
Tabelle 54:	Genexpressionsdaten aus dem Microarray für die Gene <i>Serpinc1</i> , <i>Fgg</i> , <i>Fgb</i> und <i>F10</i> in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse	122
Tabelle 55:	Genexpressionsdaten aus dem Microarray für das Gen <i>Tdo2</i> in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse	123
Tabelle 56:	Genexpressionsdaten aus dem Microarray für die Gene <i>Cyp1a1</i> , <i>Cyp1a2</i> , <i>Cyp1b1</i> , <i>Aldh3a1</i> , <i>Nqo1</i> , <i>Ugt2b35</i> sowie <i>AhR</i> in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse	123
Tabelle 57:	Microarray-Daten für das <i>AhR</i> -Gen in den Lebern weiblicher behandelte AhR ^{+/+} - und AhR ^{-/-} -Mäuse.....	126
Tabelle 58:	Microarray-Daten für das <i>AhR</i> -Gen in den Nieren behandelte AhR ^{+/+} und AhR ^{-/-} Mäuse	128
Tabelle 59:	Microarray-Daten für das Gen <i>Cyp1b1</i> in den Lebern behandelte AhR ^{+/+} und AhR ^{-/-} Mäuse	131
Tabelle 60:	Microarray-Daten für die Gene <i>Cyp1a1</i> , <i>Cyp1a2</i> , <i>Cyp1b1</i> , <i>Cyp2b10</i> und <i>Cyp3a44</i> in den Nieren behandelte AhR ^{+/+} und AhR ^{-/-} Mäuse	135
Tabelle 61:	Microarray-Daten für die Gene <i>Serpinc1</i> , <i>Fgg</i> , <i>Fgb</i> und <i>F10</i> in den Nieren behandelte Mäuse.....	141
Tabelle 62:	Microarray-Daten für die Gene <i>Hba-a1</i> , <i>Hba-a2</i> , <i>Hbb-b1</i> , <i>Hbb-b2</i> und <i>Rps14</i> in den Nieren weiblicher TCDD-behandelter Mäuse	142
Tabelle 63:	Microarray-Daten für das Gen <i>Tdo2</i> in den Nieren weiblicher TCDD-behandelter Mäuse	155
Tabelle 64:	Microarray-Daten für die Gene <i>Hbb-b1</i> , <i>Hbb-b2</i> und <i>Hba-a2</i> in den Lebern weiblicher TCDD-behandelten Mäuse	156
Tabelle 65:	Microarray-Daten für das Gen <i>Lpl</i> in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter Mäuse	158
Tabelle 66:	Microarray-Daten für die Gene <i>Anxa1</i> und <i>Pla2g4a</i> in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter Mäuse.....	160
Tabelle 67:	Microarray-Daten für das Gen <i>c-Myc</i> in den Lebern (Dissertation Lohr 2013) und in den Nieren TCDD-behandelter Mäuse	161
Tabelle 68:	Liste der Gene, die mit c-Myc in Verbindung gebracht werden können und die entsprechende Literatur	164
Tabelle 69:	Microarray-Daten für die Gene <i>Afp</i> , <i>Asns</i> , <i>E2f3</i> und <i>Pla2g4a</i> in den Lebern (Dissertation Lohr 2013) und Nieren weiblicher TCDD-behandelter Mäuse	167
Tabelle 70:	Microarray-Daten für die Gene <i>Cyp24a1</i> , <i>Cyp27b1</i> und <i>VDR</i> in den Lebern (Dissertation Lohr 2013) und Nieren weiblicher TCDD-behandelter Mäuse	171

Tabelle 71:	Microarray-Daten für die Gene <i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> und <i>IL-10</i> und <i>TNF-α</i> in den Lebern der weiblichen TCDD-behandelten Mäuse (Dissertation Lohr 2013)	177
Tabelle 72:	Microarray-Daten für die Gene <i>Esm1</i> , <i>Igfbp1</i> und <i>Cdh1</i> in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter Mäuse(Dissertation Lohr 2013).....	181
Tabelle 73:	Im Maus-Vollblut identifizierte Metaboliten mit den dazugehörigen Molekülmassen, Massenpeaks [M +H ⁺] und den erzeugten Fragmenten (CE 10-25 e.V.).....	187
Tabelle 74:	Vergleich der Integrale identifizierter Metaboliten und unbekannter Massensignale in den LC-MS-Messungen	192
Tabelle 75:	Gene, die sowohl in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp wie auch AhR-Knockout Mäusen gemeinsam hoch-reguliert sind.....	239
Tabelle 76:	In AhR-Wildtyp herunterregulierte und in AhR-defizienten-Mäusen hochregulierte Gene durch Behandlung mit TCDD.....	239
Tabelle 77:	In AhR-Wildtyp hochregulierte und in AhR-defizienten Mäusen herunterregulierte Gene durch Behandlung mit TCDD.....	240
Tabelle 78:	Alle signifikant hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse	241
Tabelle 79:	Alle signifikant herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse.....	244
Tabelle 80:	Alle signifikant hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse	251
Tabelle 81:	Alle signifikant herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse	256
Tabelle 82:	Liste aller detektierten m/z-Verhältnisse mit Integral und Standardabweichung in den Mäusen	261

1. Einleitung und Fragestellung

Im täglichen Leben sind Lebewesen wie Mensch und Tier einer Vielzahl an Fremdstoffen ausgesetzt, die entweder inhalativ oder dermal absorbiert sowie durch die Nahrung (oral) aufgenommen werden können. Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe sind eine Stoffklasse dieser Fremdstoffe und erweckten in der Vergangenheit immer wieder durch Industrieunfälle und Nahrungsmittelskandale enormes mediales Interesse. Erst im Dezember 2010 gelangten in Deutschland mit polychlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffen belastete technische Fettsäuren über Futtermittel in Schweinemast- und Legehennenbetriebe (BfR, 2011).

Die Stoffgruppe der polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe umfasst polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und Dibenzofurane (PCDF), polychlorierte bzw. polybromierte Biphenyle aber auch Naphthalene und Azoxybenzene. PCDDs und PCDFs werden umgangssprachlich auch als „Dioxine“ bezeichnet, zu denen auch das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) zählt. Dioxine entstehen als unerwünschte Verunreinigungen bzw. Begleitstoffe unter anderem bei Verbrennungsprozessen organischer Materialien wie Holz und Klärschlamm, Tabakrauch oder während der Müllverbrennung sowie als Nebenprodukt chlororganischer Synthesen (Ballschmiter und Bacher, 1996; IARC, 1997). Aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Stabilität sind Dioxine metabolisch und ökologisch persistent und reichern sich aufgrund ihrer hohen Lipophilie in der Umwelt an und akkumulieren vor allem im tierischen Fettgewebe. Hauptaufnahmequelle für den Menschen ist daher die Nahrung insbesondere Milchprodukte, Fleisch und Fisch (IARC, 1997; Marquardt und Schäfer, 2004).

Der wohl bekannteste Vertreter der Dioxine ist TCDD, das zu den toxischsten Kongeneren der PCDDs gehört und als Tumorpromotor wirkt. Ziele adverser TCDD-Effekte sind vor allem Haut und Leber, aber auch die Schilddrüse, das kardiovaskuläre System sowie das Immunsystem können betroffen sein (Marquardt und Schäfer, 2004). Adverse Effekte treten abhängig von Spezies und Geschlecht bereits bei Konzentrationen im Bereich von wenigen Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht auf (Ballschmiter und Bacher, 1996). Ein Großteil der Wirkungen von TCDD wird über die Aktivierung eines zytosolischen Rezeptorproteins, des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR), vermittelt. Dieser bildet nach Bindung von Liganden wie TCDD im Zellkern zunächst ein Heterodimer mit ARNT (*AhR nuclear translocator*). Dieses Dimer wirkt anschließend als Transkriptionsfaktor und führt zur gesteigerten Expression einer Vielzahl von Genen wie z.B. fremdstoffmetabolisierender Enzyme, darunter Vertreter der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (Boutros *et al.*, 2009; Rowlands und Gustafsson, 1997).

Auch wenn in der Literatur Einigkeit darüber besteht, dass die Meisten toxischen Wirkungen des TCDD über den AhR vermittelt werden, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden,

dass auch TCDD-Wirkungen unabhängig von der Funktionsfähigkeit des AhR auftreten (Boutros *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2002; Tijet *et al.*, 2006). Der AhR scheint auch in den Nieren eine wichtige Rolle zu spielen, da in den Nieren AhR-defizienter-Mäuse die Gefäßarchitektur im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verändert ist (Lahvis *et al.*, 2000). Aber nur wenige Studien befassen sich mit der Induktion von Genexpressionsmustern in den Nieren AhR-defizienter-Mäuse und Wildtyp-Mäuse nach der Behandlung mit TCDD (Boutros *et al.*, 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Niere als eines der Hauptorgane ausgewählt. Ziel war die Erforschung der Mechanismen der Toxizität von TCDD sowie der Einfluss des AhR und seiner physiologischen Rolle infolge der Behandlung AhR-defizienter-Mäuse (AhR^{-/-}) und Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) mit TCDD. Hierfür sollten Genexpressionsmuster in den Nieren TCDD-behandelter Wildtyp-Mäuse mit denen TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse durch DNA-Array-Techniken (Microarray) vergleichend betrachtet werden. Anschließend sollten ausgewählte Expressionsmuster in den Nieren sowie in den Lebern mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verifiziert werden. Die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Organen Leber, Niere, Lunge und Milz von AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen nach der Behandlung mit TCDD sollte auf Proteinebene mit Western Blot und auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR bestimmt werden. Die Enzymaktivität der Cytochrom P450-Enzyme 1a1 und 1a2 sollte mit Hilfe des EROD-Assays überprüft werden. Außerdem sollte mittels Metabolomics-Analyse eine AhR Metabolomics Plattform etabliert werden. Dazu sollte die HPLC-MS/MS-Technik zur Untersuchung des Maus-Blutes herangezogen werden, um sämtliche erfassbaren Veränderungen des endogenen Metabolitenspektrums in AhR-defizienten-Mäusen sowie Wildtyp-Mäuse mit und ohne TCDD-Behandlung aufzuklären. Die Erkenntnisse zum Einfluss von TCDD auf das Metabolom sollten die Datenbasis zur Risikobewertung dieser Stoffklasse wesentlich bereichern und das bisherige risk assessment verbessern.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde an der Technischen Universität Kaiserslautern im Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie unter der Aufsicht von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk durchgeführt. Finanziell unterstützt wurde das Forschungsvorhaben von der „Stiftung Innovation Rheinland-Pfalz“.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

2.1.1 Allgemein

Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF), polychlorierte bzw. polybromierte Biphenyle (PCBs bzw. PBBs) sowie Naphthalene und Azoxybenzene sind eine Gruppe ubiquitär in der Umwelt vorkommender Kontaminanten. PCDDs und die physikalisch, chemisch und toxikologisch ähnlichen PCDFs werden auch umgangssprachlich unter dem Begriff „Dioxine“ zusammengefasst. Das potenteste und bekannteste Kongener mit vier Chlorsubstituenten an den lateralen Positionen 2,3,7,8 ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD; Strukturformel siehe Abbildung 1) (Fiedler, 2003; IARC, 1997; Van den Berg *et al.*, 2006).

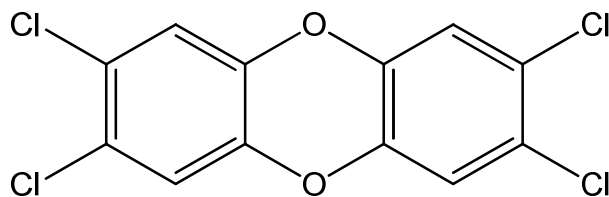


Abbildung 1: Strukturformel von TCDD

Ein Teil dieser Verbindungen kommt nur als Verunreinigungen in industriellen Produkten vor oder entsteht bei der Verbrennung organischer Substanzen in Anwesenheit organischer und anorganischer Chlorverbindungen, während der andere Teil der Verbindungen industriell hergestellt wird. Für die Risikobewertung dieser polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen wird das System der *toxic equivalency factors* (TEFs) verwendet. In der Gruppe der dioxinartigen Substanzen ist TCDD aufgrund seiner hohen Toxizität die potenteste Verbindung dieser Substanzklasse und bildet daher die Referenzsubstanz für das Dioxin TEF-Konzept mit einem TEF von 1,0. Alle anderen Verbindungen erhalten abhängig von ihrer Toxizität einen niedrigeren Wert. Durch Multiplikation der Konzentration der dioxinartigen Einzelverbindungen mit den entsprechenden TEFs ergeben sich die TCDD-Äquivalente (*toxic equivalents* (TEQs)), die ein Maß für die Toxizität von dioxinartigen Substanzgemischen im Vergleich zur Referenzsubstanz TCDD darstellen. In Abbildung 2 ist die dazugehörige Formel zur Berechnung der TEQs aufgeführt (van den Berg *et al.*, 2000).

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (C_i \times TEF_i)$$

Abbildung 2: Formel zur Berechnung des TEQ

TEF_i = *toxic equivalency factor* der einzelnen Kongenere
 n = Anzahl der Kongenere
 i = Kongener
 C_i = Konzentration der einzelnen Kongenere

Zur Aufnahme einer Substanz in das TEF-Konzept müssen folgende Kriterien erfüllt sein. Die Substanz muss eine strukturelle Ähnlichkeit zu den PCDDs besitzen, sie muss an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) binden und die biochemische sowie toxische Wirkung, ähnlich zu den Wirkungen von TCDD, muss AhR-vermittelt sein. Des Weiteren muss eine gewisse Persistenz der Substanz vorhanden sein und sie muss sich in der Nahrungskette anreichern (van den Berg *et al.*, 2000).

2.1.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften in der Familie der polychlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffe variieren sehr stark (Mackay *et al.*, 2006). Dennoch sind sie weitestgehend stabil gegenüber Säuren und Basen, Oxidations- und Reduktionprozessen sowie temperaturstabil bis 700 °C. Die thermodynamische Stabilität nimmt mit dem Chlorierungsgrad zu. Aufgrund ihrer Resistenz gegenüber chemischem und biologischem Abbau sind Dioxine sehr persistent und akkumulieren in der Nahrungskette und durch deren Aufnahme in Leber und im Fettgewebe (Cornell, 2005; Jones und de Voogt, 1999; Lohmann und Jones, 1998).

2.1.3 Entstehung, Verwendung und Exposition

Der Haupteintrag von TCDD in die Umwelt erfolgt durch Verbrennung von Abfall, Klärschlamm sowie Holz und es wird vor allem in Abgasen emittiert. Des Weiteren kommt TCDD als Verunreinigung in der technischen Herstellung von Chlorphenolen, die als Herbizide und Insektizide eingesetzt werden, sowie von Farben und Pigmenten vor. Auch in anderen chemischen Prozessen wie der Zellstoffbleichung und Metallschmelze kann TCDD als Nebenprodukt entstehen. Für kommerzielle Zwecke wurde TCDD nie großtechnisch hergestellt, nur ein kleiner Teil wurde für wissenschaftliche Forschungszwecke synthetisiert

(Poland und Knutson, 1982). Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit und hohen Lipophilie reichert sich TCDD in der Nahrungskette, vor allem in tierischem Fett, Molkereiprodukten und Fisch an. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Dioxinen und dioxin-ähnlichen Verbindungen nimmt seit den 1980er Jahren stetig ab und beträgt heute weniger als 1 pg/kg Körpergewicht (KG). In Deutschland beträgt die tägliche Durchschnittsbelastung ca. 0,7 pg TEQ/kg KG, wobei 90-95 % mit der Nahrung aufgenommen werden (EFSA, 2010). Der TDI (*tolerable daily intake*) von Dioxinen und dioxin-ähnlichen Verbindungen wurde von der World Health Organization (WHO) im Jahre 1998 anhand ermittelter LOAELs (*lowest observed adverse effect level*) verschiedener Spezies auf 1-4 pg TEQ/kg KG/Tag festgelegt. Der LOAEL gibt dabei die geringste Menge an, die bei der Aufnahme schädliche Effekte zeigt (WHO, 1998). In einer Stellungnahme des *Scientific Committee on Food* (SCF) aus dem Jahre 2001 wurde von einer wöchentlichen Aufnahmemenge (TWI) von 14 pg/kg KG ausgegangen (SCF, 2001). Aufgrund der hohen Persistenz akkumuliert TCDD in Leber und im Fettgewebe. Der mittlere Gehalt an TCDD beim Menschen im Fettgewebe liegt bei etwa 2-3 ng/kg Fettgewebe (20-30 ng gesamt TEQ/kg Fettgewebe; IARC, 1997).

Eine weitere Expositionsquelle neben dem Eintrag aus der Nahrungskette, ist die Exposition am Arbeitsplatz oder durch industrielle Unfälle. Im Jahre 1976 wurde bei einer Explosion eines Trichlorphenol-Reaktors auf dem Werksgelände der Firma Icmesa in Seveso (Italien) bis zu 30 kg TCDD in die Luft freigesetzt. Im Umkreis von 18 km² waren über 37 000 Menschen von der TCDD-beinhalteten Aerosolwolke betroffen und führte zur bisher höchsten bekannten TCDD-Exposition von Menschen. In den Kontaminationszonen A und B wurden in einer großen Kohorte ein Mittelwert von 56 ppt TCDD (Spannweite zwischen 2,5-56 000 ppt) gemessen (Eskenazi *et al.*, 2003; Mocarelli *et al.*, 2008).

2.1.4 Toxikokinetik von TCDD

TCDD wird überwiegend über den Gastrointestinaltrakt (GIT) absorbiert, geringe Mengen können aber auch inhalativ und dermal absorbiert werden (Van den Berg *et al.*, 1994). Die Absorptionsrate in Ratten über den GIT einer einzelnen TCDD-Dosis (1 µg/kg KG) betrug ca. 8 %. Bei wiederholter TCDD-Gabe (0,1 bis 1 µg/kg KG pro Tag) konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden (Piper *et al.*, 1973; Rose *et al.*, 1976). Nach erfolgter Absorption, verteilt sich TCDD im gesamten Körper, da es vorrangig über das lymphatische System transportiert wird. Im Blut liegt TCDD hauptsächlich an Lipoproteine, Serumlipide, Albumin sowie an zelluläre Komponenten gebunden vor. In Studien an Ratten akkumulierte TCDD innerhalb der ersten Tage in Leber und im Fettgewebe sowie in kleineren Mengen in der Haut und in der Schilddrüse (Pohjanvirta *et al.*, 1990). Die Toxikokinetik von TCDD beruht einerseits auf der hohen Lipophilie andererseits aber auch auf der Tatsache, dass es in den Lebern an Cyp1a2 bindet und dieses auch induziert (Diliberto *et al.*, 1997; Gillner *et al.*,

1987). Eine Beteiligung von Cyp1a2 an der Einlagerung von TCDD in den Lebern konnte mittels transgenen Cyp1a2-defizienten Mäusen in einer Studie von Diliberto *et al.* belegt werden. In dieser Studie wurden zum einen C57BL/6N-Mäuse zum anderen Cyp1a2-defiziente Mäusen einmalig mit [³H] TCDD (25 µg) behandelt. TCDD lagerte sich vier Tage nach der Gabe in den Lebern von C57BL/6N Mäusen ab. Dies wurde in den transgenen Mäusen nicht beobachtet. Hier fand eine Ablagerung im adipösen Fettgewebe statt (Diliberto *et al.*, 1999). In Ratten erfolgt eine Abschätzung der Halbwertszeit von TCDD Organ- und dosisabhängig. Die Eliminationshalbwertszeit von TCDD im Fettgewebe von Ratten beträgt ca. 25 Tage. Die Elimination in Leber verläuft dahingegen anders und ist abhängig von der aufgenommenen TCDD-Menge. Die Halbwertszeit verringert sich, wenn die aufgenommene Menge an TCDD die Dosis von 1000 ppt Nettogewicht übersteigt. Lag die Dosis unter 1000 ppt, so betrug die Halbwertszeit ca. 33 Tage. Überschreitet die Dosis die 1000 ppt, so verringert sich die Halbwertszeit und betrug ca. 17 Tage (Walker *et al.*, 2000). Die Halbwertszeit von TCDD in den Lungen von Ratten lag bei 39,7 Tagen und im Serum beträgt sie 44,6 Tage (Tritscher *et al.*, 2000). Die Eliminationshalbwertszeit im ganzen Körper bei Ratten liegt zwischen 2 und 4 Wochen (USEPA, 2000). Mehrere Studien belegen, dass die Eliminationshalbwertszeit beim Menschen im Bereich von 7 bis 11 Jahren liegt (Milbrath *et al.*, 2009; Pirkle *et al.*, 1989; Wolfe *et al.*, 1994).

2.1.5 Metabolismus und Ausscheidung

TCDD und verwandte Substanzen sind sehr lipophil, wobei die Lipophilie mit dem Chlorierungsgrad ansteigt. Der Chlorierungsgrad hat dadurch einen Einfluss sowohl auf die Absorption der Substanzen als auch auf die Gewebeverteilung. Der Metabolismus ist der limitierende Schritt bei der Eliminierung dieser Substanzen. Die Metabolisierung und Eliminierung erfolgt sehr langsam (WHO, 1998). Der Metabolismus von PCDD/Fs korreliert mit der Anzahl und Position der Chlorsubstituenten. Je höher der Chlorierungsgrads eines Kongeners ist, desto geringer ist dessen Metabolisierungsrate (Van den Berg *et al.*, 1994). Untersuchungen mit radioaktiv markiertem TCDD an Ratten und Mäusen zeigten, dass mehr als 90 % des radioaktiv markierten TCDDs über Urin und Galle als polare Metaboliten ausgeschieden wurden (Gasiewicz *et al.*, 1983; Poiger und Schlatter, 1979; Poiger *et al.*, 1982; Ramsey *et al.*, 1982). In einer Studie von Sorg *et al.* wurden zwei TCDD Metabolite (2,3,7-trichloro-8-hydroxydibenzo-*p*-dioxin und 1,3,7,8-tetrachloro-2-hydroxy-dibenzo-*p*-dioxin) in Fäces, Urin und Serum eines Patienten nach akuter TCDD Intoxikation identifiziert (Sorg *et al.*, 2009). Da es sich bei TCDD um eine sehr lipophile Verbindung handelt, reichert es sich nicht nur im Körperfett, sondern auch in der Muttermilch (Schechter und Gasiewicz, 1987).

2.1.6 Akute und chronische/subchronische Toxizität

TCDD zählt zu den toxischsten Substanzen die bislang identifiziert wurden und verursacht ein breites Spektrum an biochemischen und toxischen Effekten. Die Sensitivität eines Organismus bezüglich des toxischen Potentials von TCDD ist eng mit dem Ah-Rezeptor verbunden. Die meisten der verfügbaren Toxizitätsstudien zu TCDD stammen aus Tierversuchen. Verschiedene Spezies reagieren meist mit teils sehr unterschiedlicher Sensitivität auf eine akute TCDD Exposition. Das männliche Meerschwein reagierte mit einer LD₅₀ von 0,6 µg/kg KG am sensitivsten (Schwetz *et al.*, 1973). Dagegen reagierte der männliche Hamster mit einem LD₅₀ von 5,051 mg/kg KG am wenigsten empfindlich (Henck *et al.*, 1981). Für die männliche Ratte beträgt die LD₅₀ 22 µg/kg KG (Schwetz *et al.*, 1973). Bei akuter TCDD Intoxikation tritt entgegen des toxischen Potentials vieler anderer Stoffe der Tod nicht unmittelbar, sondern speziesabhängig mit einer deutlichen Verzögerung von 7 bis 50 Tagen ein. Ein unmittelbar nach akuter Exposition auftretendes Symptom ist das Wasting-Syndrom. Es äußert sich in einem rapiden Gewichtsverlust von bis zu 50 % des ursprünglichen Körpergewichtes des Versuchstieres (Moffat *et al.*, 2010; Seefeld *et al.*, 1984). Ein weiterer Effekt, der mit dem *Wasting*-Syndrom assoziiert werden kann, ist die Abnahme des Vitamin A-Gehaltes in den Sternzellen der Leber (Håkansson *et al.*, 1991; Thunberg *et al.*, 1979). Bisher konnte jedoch der molekulare Mechanismus des TCDD-induzierten *Wasting*-Syndroms noch nicht aufgeklärt werden. Allerdings konnte in einer Studie mit Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor Knockout-Mäusen (AhR^{-/-}) gezeigt werden, dass der AhR am Gewichtsverlust beteiligt ist. In den AhR-Knockout-Mäusen wurde das *Wasting*-Syndrom nicht beobachtet (Fernandez-Salguero und Gonzalez, 1996; Gonzalez and Fernandez-Salguero, 1998; Seefeld *et al.*, 1984). Die Leber ist das Hauptzielorgan von TCDD. In Nagern und anderen Spezies führt TCDD zu einer stark vergrößerten Leber, was auf Hyperplasie und Hypertrophie der parenchymalen Zellen beruht (Poland and Knutson, 1982). Weitere Effekte in den Lebern von Mäusen und Ratten sind die Induktion hepatischer Gene und Enzyme sowie ein erhöhtes Lebergewicht, Leberentzündung, Leberfibrose, Nekrose, Lebersteatose, Hyperbilirubinämie, Hypercholesterolämie und Störung des Energie-Stoffwechsels (Angrish *et al.*, 2013, 2012; Niittynen *et al.*, 2003; Pierre *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1998).

Einer der am bestuntersuchtesten TCDD-vermittelten Effekte in den Lebern von Nagern ist die Induzierung der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Die Induktion von CYP1A1 ist der sensitivste und früheste Indikator für eine Exposition mit Dioxin (Drahashuk *et al.*, 1996; Nebert *et al.*, 2000; Vanden Heuvel *et al.*, 1993). Welchen Beitrag die Induktion der CYP1A Isoenzyme bei den adversen Effekten von TCDD leistet ist bisher noch nicht geklärt. Die Induktion der Cytochrom P450-Enzyme könnte zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativem Stress führen, der mit oxidativen DNA-Schäden verknüpft ist (Knerr und Schrenk, 2006; Park *et al.*, 1996). Des Weiteren induziert TCDD in den Lebern von Nagern AhR-vermittelt auch andere Gene der Phase I und Phase II

des Fremdstoffmetabolismus wie z.B. *Nqo1*, *Aldh3a1*, *Gsta1* und *Ugt1a6*, die als klassische AhR Genbatterie bezeichnet werden (Nebert *et al.*, 2000). Ebenso induziert TCDD Gene, die mit Zellentwicklung, -wachstum und -differenzierung verknüpft sind (Bock und Köhle, 2006). Da TCDD den Hormonhaushalt stört wird durch chronische bzw. subchronische Gabe von TCDD die Schilddrüsenfunktion beeinflusst. In TCDD-exponierten Tieren konnte eine dosisabhängige Reduktion des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T₄) beobachtet werden. Dieser Effekt resultiert aus der Induktion einer AhR abhängigen UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), die T₄ glucuronidiert. Im Gegenzug wird die Sekretion des Thyroid-stimulierenden Hormons (TSH) stimuliert (Pazdernik und Rozman, 1985; Sewall *et al.*, 1995; Van Birgelen *et al.*, 1995a, 1995b).

Eine Vielzahl von Studien belegt die immuntoxische Wirkung von TCDD. Sowohl die zellvermittelte, als auch die humorale Immunantwort wird nach TCDD-Exposition unterdrückt. Dabei wird vermutet, dass mehrere zelluläre Targets innerhalb des Immunsystems von TCDD beeinflusst werden (Holsapple *et al.*, 1991; Vos *et al.*, 1973).

An Wirbeltieren konnte nach TCDD-Exposition ebenfalls eine Reproduktionstoxizität beobachtet werden. Dabei kam es zu erhöhten pränatalen Mortalitätsraten, funktionellen Veränderungen in Lern- und Sexualverhalten sowie Veränderungen in der Entwicklung des Reproduktionssystems (Peterson *et al.*, 1993; USEPA, 2000). TCDD führt bei weiblichen Ratten zu einer verminderten Fertilität und zu Frühgeburten (Kociba *et al.*, 1976; Li *et al.*, 1995). Bei männlichen Tieren führt die Exposition mit TCDD zu verkleinerten Sexualorganen. Des Weiteren veränderte es die Testesmorphologie und verminderte die Spermatogenese sowie Fertilität in erwachsenen Ratten (Chahoud *et al.*, 1989; McConnell *et al.*, 1978).

2.1.7 Kanzerogenität und Tumorpromotion

Im Nager konnte die Kanzerogenität von TCDD in einer Vielzahl von Tierstudien belegt werden. Die TCDD-Applikation erfolgte dermal, über die Nahrung oder per Schlundsonde (Della Porta *et al.*, 1987; NTP, 1982; Tóth *et al.*, 1979). In einer Studie des *National Toxicology Program* (NTP) wurde TCDD (0,001 oder 0,005 µg pro Tier an drei Tagen pro Woche) männlichen und weiblichen Swiss-Webster-Mäusen für 99 bzw. 104 Wochen auf den Rücken appliziert. In weiblichen Tieren war die Inzidenz für Fibrosarkome im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. In männlichen Mäusen war die erhöhte Inzidenz ebenfalls zu beobachten, jedoch nicht statistisch signifikant (NTP, 1982). In einer weiteren Studie von Toth *et al.* wurde einmal pro Woche TCDD (0,007, 0,7 oder 7 µg/kg KG) per Schlundsonde männlichen Swiss/H/Riop-Mäusen über einen Zeitraum von einem Jahr verabreicht. Die Gabe von TCDD verursachte eine erhöhte Lebertumor-Inzidenz (hepatozelluläre Adenome und Karzinome) in den Mäusen. Eine erhöhte Inzidenz für Lungentumore oder Lymphome wurde nicht beobachtet (Tóth *et al.*, 1979).

In einer Studie von Della Porta *et al.* wurde männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen einmal pro Woche per Schlundsonde TCDD (2,5 oder 5 µg/kg KG) für 52 Wochen verabreicht. In den behandelten Mäusen war die Inzidenz an Nicht-Neoplasien wie Lebernekrose, Amyloidose verschiedener Gewebe und Nephrosklerose im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ein signifikant erhöhter und dosisabhängiger Anstieg für hepatozelluläre Adenome und Karzinome konnte ebenfalls in den behandelten Mäusen beobachtet werden (Della Porta *et al.*, 1987).

TCDD agiert als Tumorpromotor während der Krebsentwicklung. Die Gabe von TCDD nach der einmaligen Behandlung mit einem bekannten Hepatokarzinogen wie Diethylnitrosamin (DEN) oder 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (DMBA) erhöhte die Inzidenz für viele Tumortypen wie Lungen- und Leberadenome, Hepatoblastome oder Hautpapillome in Mäusen (Knerr und Schrenk, 2006). In einer Tumorpromotions-Studie von Beebe *et al.* wurde fünf Wochen alten, männlichen C57BL/6-, DBA/2- und B6D2F1-Mäusen einmalig DEN (90 mg/kg KG) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Drei Wochen später erhielten die Mäuse TCDD (0,05 µg/kg KG pro Woche) für 20 Wochen und wurden bis Woche 52 beobachtet. TCDD erhöhte die Lebertumor-Inzidenz (alle Tumortypen) in B6D2F1-Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die nur mit DEN behandelt wurden. In C57BL/6- und DBA/2-Mäusen konnte keine signifikant erhöhte Lebertumor-Inzidenz beobachtet werden. Ebenso wurde in allen drei Mäusestämmen keine signifikant erhöhte Lungentumor-Inzidenz nach der Gabe von TCDD beobachtet (Beebe *et al.*, 1995).

2.2 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR)

In einer Studie aus dem Jahre 1976 von Poland und Glover konnte an C57BL/6J-Mäusen gezeigt werden, dass im Leberzytosol von Mäusen ein Protein vorhanden ist, das radioaktiv gelabeltes TCDD mit hoher Affinität (im nanomolaren Bereich) reversibel bindet. Poland *et al.* gelang es in einer weiteren Studie dieses Protein zu charakterisieren. Das Protein wurde aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität von aromatischen Kohlenwasserstoffen als Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) bezeichnet. Oftmals wird dieser Rezeptor auch „Dioxin-Rezeptor“ genannt. Voraussetzung für die Bindung von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen an den AhR sind unter anderem eine planare Struktur sowie Halogensubstituenten an den lateralen Ringpositionen (Poland und Knutson, 1982; Poland *et al.*, 1976). Der AhR gehört zur *basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim* (bHLH/PAS) Familie, die als Ligandenabhängige Transkriptionsregulatoren agieren und in nahezu allen Zellen und Geweben des Menschen nachgewiesen wurden. Die höchsten Expressionen wurden in Leber, Lunge, Thymus und Testes beobachtet (Fujii-Kuriyama und Kawajiri, 2010; Hahn, 1998; Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007). In Abbildung 3 ist die Struktur des AhR schematisch dargestellt. Das AhR-Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne, die für die DNA-Bindung (DBD), die Ligandenbindung (LBD) sowie die Dimerisierung mit ARNT (*AhR*

nuclear translocator) verantwortlich ist und einer C-terminalen Transaktivierungs-Domäne. Die Dimerisierung des AhR mit ARNT ist essentiell für seine spezifische Interaktion mit responsiven Elementen der DNA (Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007).

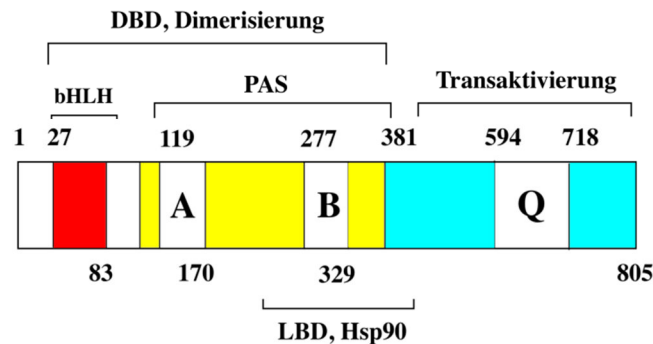


Abbildung 3: Schematische Darstellung des murinen AhR-Proteins (nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007)

A, B: schwach homologe repetitive Regionen
 Q: Glutamin-reiche Transaktivierungs-Domäne
 DBD: DNA-Bindungsdomäne
 LBD: Ligandenbindungsdomäne
 bHLH: *basic helix-loop-helix*-Domäne

In der bHLH-Domäne befindet sich eine Kernlokalisierungs-Sequenz (NLS) und eine Kernexport-Sequenz (NES). In Richtung des C-Terminus ist die PAS-Domäne lokalisiert, die sich aus den beiden Untereinheiten A und B zusammensetzt. Aufgrund ihrer Struktur und Lokalisierung beeinflusst die PAS-Domäne Protein-Protein-Interaktionen. Es wird vermutet, dass in Abwesenheit eines Liganden Hsp90 (*heatshock protein 90*) mit der PAS-B Region sowie mit der bHLH-Domäne interagiert und somit die NLS maskiert wird. Dies stabilisiert die ligandenbindende Konformation des AhR und bewirkt, dass der AhR im Zytoplasma verbleibt. Die NES-Sequenz ist für den Export des AhR aus dem Zellkern verantwortlich (Bradfield *et al.*, 1991; Denison und Nagy, 2003; Fujii-Kuriyama und Kawajiri, 2010; Hahn, 2002; Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007).

2.2.1 AhR-Signaltransduktion

In Abbildung 4 ist eine schematische Darstellung der AhR Signaltransduktion dargestellt. In Abwesenheit eines Liganden liegt der AhR im Zytosol gebunden an die Proteine Hsp90, p23 (Ko-Chaperon) und XAP2 (*hepatitis b virus X-associated protein 2*) inaktiv vor. Bindet ein Ligand wie z. B. TCDD an den AhR-Knockout kommt es zur Transformation, die die

Ligandenbindung verstärkt und die Freilegung der NLS zur Folge hat. Dabei dissoziiert XAP2 ab und der Rezeptor-Ligand-Komplex transloziert daraufhin in den Zellkern. Dort bildet er nach Abspaltung von Hsp90 und p23 ein Dimer mit ARNT, einem weiteren Mitglied der bHLH/PAS-Familie (Reyes *et al.*, 1992; Safe, 2001; Whitlock *et al.*, 1996).

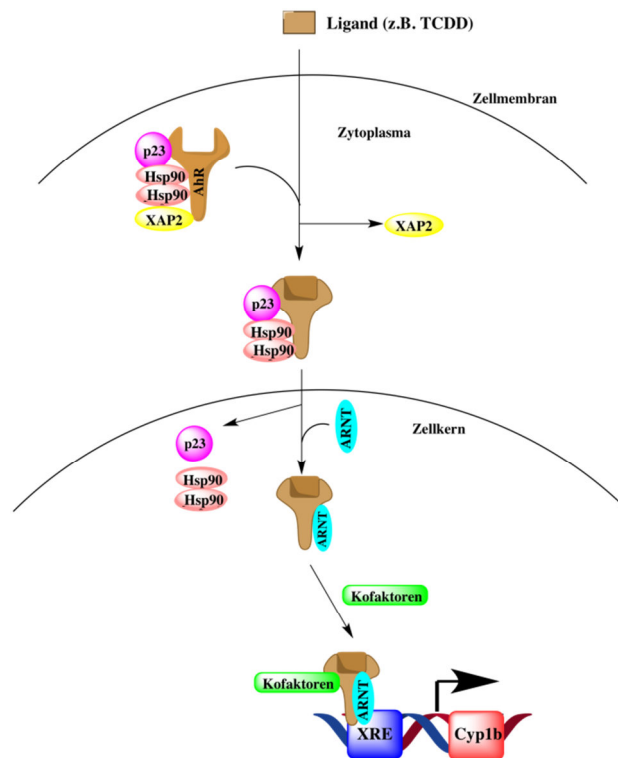


Abbildung 4: Schematische Darstellung der AhR-Signaltransduktion (nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007)

Das AhR/ARNT-Heterodimer bindet mit hoher Affinität an bestimmte Sequenzen in der DNA, den DREs (*dioxin-responsive elements*, auch *xenobiotic-responsive elements* (XRE) genannt). Die DREs enthalten die für die Bindung essentielle Nukleotidabfolge 5'-TGCGTG-3' und befinden sich in Enhancer-Regionen der regulierten Gene (Safe, 2001; Whitlock *et al.*, 1996). Die Bindung des AhR an die DNA scheint aber auch unabhängig von vollständigen DREs zu funktionieren. Es konnte belegt werden, dass der AhR auch innerhalb von codierenden Genabschnitten binden kann (Kinehara *et al.*, 2008). Bindet das AhR/ARNT-Dimer an die DNA führt dies zu einer Auflockerung des Chromatins. Dadurch erhalten Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit mit dem Promotor zu interagieren. Dies beeinflusst die Regulation einer Vielzahl von Genen wie z.B. die Phase 1 Enzyme Cytochrom P450 (Cyp) 1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1, die zur klassischen AhR-Genbatterie gehören. Neben den fremdstoffmetabolisierenden CYPs werden auch Glutathion-S-transferase Ya, NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase, Aldehyd-3-dehydrogenase (Aldh3) und UDP-Glucuronotransferase 1a6 (UGT1A6) durch den AhR reguliert (Bock und Köhle, 2005; Safe und Krishnan, 1995; Sogawa und Fujii-Kuriyama, 1997; Whitlock *et al.*, 1996). Als negativer Regulator der AhR-Aktivität fungiert der AhR-Repressor (AhRR). Dieser liegt jedoch nicht

wie der AhR konstitutiv im Zellkern vor. Er dimerisiert im Zellkern mit ARNT zu einem Heterodimer. Dieses Heterodimer bindet ebenfalls an DREs der DNA. Diese Bindung führt allerdings nicht zu einer Transkriptionssteigerung der Gene. Da die Expression des AhRR AhR-abhängig reguliert wird, stellt diese einen negativen Kontrollmechanismus dar (Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007). Neben dem klassischen, genomischen Signalweg des AhR durch Dimerisierung mit ARNT, beeinflusst der AhR eine ganze Reihe anderer Signalwege. Dazu zählen verschiedene Proteinkinasen (z.B. Rezeptor-Tyrosin Kinasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) und Phosphatasen (z.B. Phosphodiesterase 2A) sowie der Cross-Talk zwischen AhR und anderen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren wie z.B. Östrogen-Rezeptor (ER), Glucocorticoid-Rezeptor (GR), *retinoid X* Rezeptor (RXR) und *epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR) (Beischlag *et al.*, 2008; Enan und Matsumura, 1995; Haarmann-Stemmann *et al.*, 2009; Matthews und Gustafsson, 2006).

2.2.2 Physiologische Rolle des AhR

Während der letzten Jahrzehnte konnte ein Großteil der physiologischen Rolle des AhR durch die Generierung AhR-defizienter- (AhR^{-/-}) Mäuse aufgeklärt werden. Da in AhR-defizienten-Mäusen das AhR-Protein nicht gebildet wird bzw. die AhR-Funktion gestört ist, sind AhR-Zielgene wie z. B. Cyp1a1 und Cyp1a2 durch Liganden wie TCDD nicht induzierbar. AhR-Knockout-Mäuse sind resistent gegen TCDD-induzierte toxische Effekte. Dies führt zur Annahme, dass der AhR höchstwahrscheinlich alle biologischen und toxischen Effekte von TCDD vermittelt (Denison und Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2002).

In den ersten Wochen nach der Geburt weisen AhR-defiziente-Mäuse eine langsamere Wachstumsrate sowie ein vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu ihren AhR-Wildtyp-Wurfgeschwistern auf. Außerdem wurde ein vermindertes Lebergewicht in AhR-defizienten-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Schmidt *et al.*, 1996). Das verminderte Lebergewicht steht mit der verminderten Hepatozytengröße, die ein Resultat des protosystemischen Shunts in AhR-Knockout-Mäusen ist, direkt in Zusammenhang. Der protosystemische Shunt entsteht durch den offenen *Ductus venosus* (Lahvis *et al.*, 2000). Der *Ductus venosus* ist eine embryonale Verbindung, die einen Großteil des arteriellen Blutes der Plazenta an der Leber vorbei über die *Vena umbilicalis*, in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) leitet. In vielen Säugetieren verschließt sich der *Ductus venosus* bereits vor der Geburt (Salomon *et al.*, 2005). Weitere Auffälligkeiten in den Lebern von AhR^{-/-}-Mäusen wie z. B. Leberverfettung, Fibrose im Portaltrakt und extramedulläre Hämatopoese wurden beobachtet (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996). Aufgrund des verminderten Retinsäure-Metabolismus in den Lebern AhR-defizienter-Mäuse kommt es zur Ansammlung von Retinsäuren, die letztendlich zu einer Leberfibrose führt (Andreola *et al.*, 2004). Der AhR scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion der Niere zu spielen. An mit Resin retrograd perfundierten Nieren wurde gezeigt, dass sich die

Gefäßarchitektur der Nieren AhR-defizienter-Mäuse von AhR^{+/+}-Mäusen unterscheidet. Eine physiologische Erklärung für den Defekt in den Nieren konnte bisher nicht gefunden werden (Lahvis *et al.*, 2000). Der AhR scheint auch eine wichtige Rolle im Fortpflanzungsapparat zu spielen. Weibliche AhR^{-/-}-Mäuse sind unfruchtbar. Ein möglicher Ursache dafür könnte in der fehlerhaften Follikelreifung und Ovulation liegen, die in Folge einer mangelhaften Estradiolsynthese in den Follikeln weiblicher AhR-defizienter-Mäuse aufgetreten war (Baba *et al.*, 2005; Mimura *et al.*, 1997). Im Immunsystem spielt der Ah-Rezeptor ebenfalls eine Rolle. Eine verminderte Anzahl von Lymphozyten ist in den Milzen von AhR^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu AhR^{+/+}-Mäusen zu beobachten, was zu einer verminderten Anzahl von B- und T-Zellen führt (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Ah-Rezeptor an der Entwicklung einiger Organe wie Leber und Niere, der Funktion des Immunsystems, Zellproliferation und -differenzierung, sowie am Retinsäure-Metabolismus beteiligt zu sein scheint. Dies würde auch die Theorie bestätigen, dass der AhR auch in Abwesenheit eines exogenen Liganden in den Zellkern transloziert (Denison und Nagy, 2003).

2.2.3 AhR-Liganden

Der AhR als Liganden-aktivierter Rezeptor ist fähig ein breites Spektrum an strukturell unterschiedlichen Substanzen zu binden. Grundsätzlich können die Liganden in zwei Gruppen unterteilt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen *high affinity* und *low affinity* Liganden. Bei den *high affinity* Liganden handelt es sich meist um aromatische, planare und hydrophobe Substanzen wie polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (polychlorierte Dibenzop-dioxine (PCDDs), Dibenzofurane (PCDFs) und dioxin-ähnliche Biphenyle (PCBs)) und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Benzo[*a*]pyren, β -Naphthoflavon, 3-Methylcholanthren), die mit hoher Affinität an den AhR binden (Hankinson, 1995). In Abbildung 5 sind Strukturformeln einiger Gruppen polyhalogener/polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe aufgeführt.

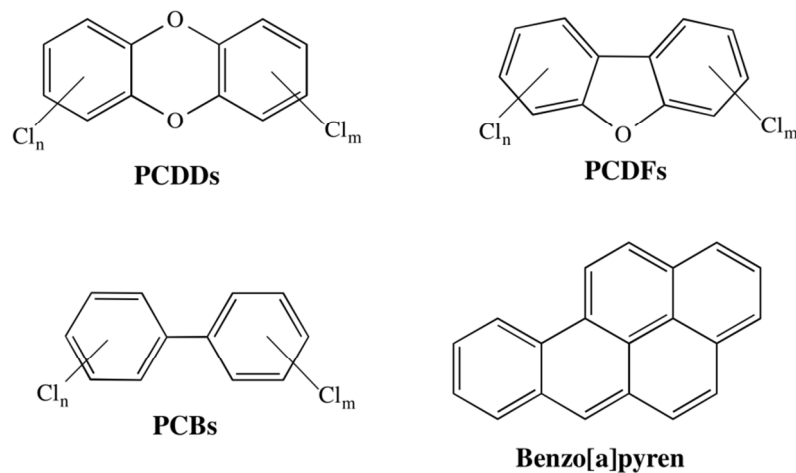


Abbildung 5: Strukturformeln einiger Gruppen polyhalogener/polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Diese Gruppen von Substanzen werden auch als die „klassischen Liganden“ bezeichnet. Eine neue Gruppe von AhR-Liganden, die sich in Struktur und physikochemischen Eigenschaften von den „klassischen Liganden“ unterscheidet, werden als „nicht-klassische Liganden“ bzw. *low-affinity* Liganden bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören sehr unterschiedliche Substanzen wie z. B. Thiabendazol (Fungizid), Omeprazol (Magensäureblocker), Carbaryl (Insektizid) und bestimmte Pharmazeutika wie YH439 (hepatoprotektiver Wirkstoff). Sie sind eher schwache *Cyp1A1*-Induktoren und binden mit geringer Affinität an den AhR (Denison und Nagy, 2003; Ledirac *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1996; Quattrochi and Tukey, 1993).

Zu den größten Expositionsquellen von AhR-Liganden zählt die Nahrung. Neben synthetischen AhR-Liganden ist ein breites Spektrum an natürlich vorkommenden Liganden in Gemüse, Früchten, Kräutern und Tees identifiziert worden. Flavonoide wie Genistein und Daidzein können den AhR-Signalweg aktivieren und induzieren AhR-Zielgene. Das natürlich vorkommende Flavonoid Quercetin erhöhte in MCF-7 Zellen AhR-abhängig die Expression und Enzymaktivität von *Cyp1A1* (Ciolino *et al.*, 1999). Ein weiterer Lebensmittelinhaltsstoff, das Curcumin, interagiert mit dem AhR und induziert *Cyp1A1* (Ciolino *et al.*, 1998). Auch einige Carotinoide und Phenole sind AhR-Liganden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich größtenteils um eher schwache Liganden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass manche dieser Substanzen im Verdauungstrakt von Säugetieren in potentere AhR-Liganden umgewandelt werden können. Ein Beispiel dafür ist Indol-3-Carbinol (I3C), das in Brassica-Arten wie Brokkoli und Rosenkohl vorkommt. I3C selbst besitzt nur eine schwache Bindungsaffinität an den AhR. In einer sauren Kondensationsreaktion, wie sie auch im Magen stattfindet, wird Indolo[3,2-*b*]carbazol (ICZ) aus I3C gebildet. Dabei handelt es sich um einen *high affinity* Liganden, der in Zellkultur AhR-abhängig die Expression von *Cyp1A1* induziert (Bjeldanes *et al.*, 1991; Denison und Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2002; Renwick *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1995).

Es konnte in mehreren Studien belegt werden, dass die AhR-Signaltransduktion auch in Abwesenheit exogener Liganden aktiv ist, was für das Vorhandensein endogener Liganden spricht. Bisher konnten bereits einige endogene Liganden mit schwacher Bindungsaffinität an den AhR wie z. B. Indole, Tetrapyrrole und Arachidonsäuremetaboliten identifiziert werden, jedoch noch kein endogener AhR-Ligand mit hoher Bindungsaffinität (Denison und Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2002; Nguyen und Bradfield, 2008).

In verschiedenen Studien konnte bewiesen werden, dass einige AhR-Liganden durch unterschiedliche biologische und physikochemische Prozesse aus Tryptophan gebildet werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Photooxidation des Tryptophan. Dabei wird der AhR Ligand FICZ (6-formylindolo[3,2-*b*]carbazol) gebildet. FICZ besitzt strukturelle Ähnlichkeit zum *high affinity* AhR-Liganden Indolo[3,2-*b*]carbazol (Oberberg *et al.*, 2005; Rannug *et al.*, 1987, 1995). Die Bildung einiger weiterer Tryptophanmetaboliten durch Lichtexposition, die an den AhR binden, konnte in weiteren Studien belegt werden. Des Weiteren bindet Kynurenin, das beim Abbau von Tryptophan entsteht, ebenfalls an den humanen und murinen AhR und induziert AhR-abhängig Cyp1A1/Cyp1a1 (DiNatale *et al.*, 2010; Opitz *et al.*, 2011).

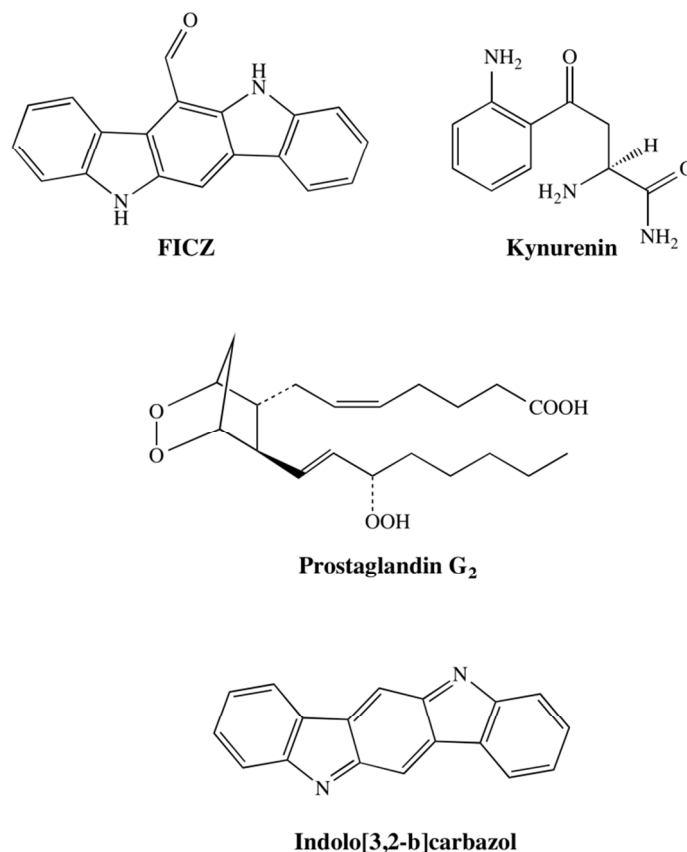


Abbildung 6: Strukturformel von FICZ, Kynurenin, Prostaglandin G₂ und Indolo[3,2-*b*]carbazol

Prostagandine wie PGB₃, PGD₃, PGH₁ können ebenfalls den AhR in murinen Hepatomzellen aktivieren. Besonders PGG₂ zeigt eine starke Induktion AhR-regulierter Gene (Seidel *et al.*, 2001).

2.2.4 AhR-Knockout-Mäuse

Knockout-Tiere stellen ein wichtiges Werkzeug in der Funktionsanalyse von Genen dar. Beim Gen-Knockout in Mäusen wird ein Funktionsverlust bestimmter Gene herbeigeführt. Dies wird durch homologe Rekombination eines entsprechenden DNA-Vektors mit der Ziel-DNA in embryonalen Stammzellen der Tiere erreicht (Graw, 2007).

AhR-Knockout-Mausstämme werden zur Unterscheidung zwischen AhR-abhängigen und -unabhängigen Dioxinwirkungen bei der Untersuchung der Toxikologie von Dioxinen eingesetzt. Dies kann z.B. durch den Vergleich der Genexpression oder des Proteinlevel in den verschiedenen Geweben zwischen AhR-Wildtyp-Mäusen und AhR-defizienten-Mäusen erfolgen (Boutros *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 1996). Das Fehlen bzw. der Funktionsverlust des AhR wirkt sich dabei nicht auf die Lebensfähigkeit der Mäuse aus, wenn gleich z. B. Auswirkungen auf die Entwicklung der Leber in Form einer verminderten Lebergröße und eines verminderten -gewicht sowie einer leichten Fibrose im Portaltrakt auftreten. Des Weiteren weisen AhR-defiziente-Mäuse eine Immunschwäche sowie Hypertrophien des Herzens auf. Gegenüber Dioxinexposition sind sie weitgehend resistent und zeigen nicht die typischen Symptome der Toxizität der Dioxine (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Gonzalez und Fernandez-Salguero, 1998; Schmidt *et al.*, 1996). Um einen gezielten Funktionsverlust des AhR-Gens herbeizuführen, muss der eingesetzte Vektor längere homologe Bereiche des AhR-Gens enthalten und eine oder mehrere Mutation/en im AhR-Gen aufweisen. Außerdem sollte der Vektor zwischen den homologen Bereichen Fremd-DNA enthalten, die das Zielgen entsprechend verändert. Hierfür wird beispielsweise ein Antibiotikaresistenzgen verwendet, um eine positiv-negativ-Selektion der transfizierten Zellen zu ermöglichen. Durch Behandlung der Zellen mit dem Antibiotikum (z. B. Neomycin) können erfolgreich transfizierte Zellen von den verbliebenen Wildtyp-Zellen selektiert werden, da letztere durch die Behandlung absterben. Erfolgreich transfizierte Zellen tragen nun das Knockout-Gen und können in junge Embryonen eingeführt werden. Sind die transfizierten Zellen in die Keimbahn gelangt, wird deren genetische Information auch auf die nächste Generation übertragen. So kann durch entsprechende Paarungen eine Knockout-Linie etabliert werden (Graw, 2007).

In der Literatur sind zwei Phänotypen (E1 und E2) beschrieben. Beide zeigen Resistenz gegenüber Dioxinexposition und weisen keine Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie Cyp1a1 und Cyp1a2 auf. Zur Generierung von AhR-defizienten-Mäusen kann entweder Exon 1 (E1) oder Exon 2 (E2) des AhR-Gens ersetzt werden. Im Phänotyp E1 wird

Exon 1, das einen Großteil des DNA-bindenden Anteils des AhR codiert, durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Von insgesamt 65 dieser Mausmutanten, starben 40-50 % innerhalb der ersten vier Tage oder wurden von den Müttern getötet. Daraufhin durchgeführte Autopsien zeigten Lymphozyteninfiltrationen verschiedener Organe wie Lunge und Darm. Die überlebenden Tiere wiesen anfangs geringere Wachstumsraten auf als die Wildtyp-Mäuse, erreichten aber das Erwachsenenalter und waren unfruchtbar. Es konnte jedoch Leberfibrose im Portaltrakt beobachtet werden (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995). Im Phänotyp E2 wird das Exon 2, das der Dimerisierung mit ARNT und der DNA-Erkennung dient, ebenfalls durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Die Sterblichkeitsrate der Phänotyp E2-Mäuse war vergleichbar mit der Wildtyp-Kontrollgruppe. Neugeborene Mäuse entwickelten in der ersten Woche nach der Geburt in den Lebern extramedulläre Hämatoopoese und mikroversikuläre Fetteinlagerungen in den Hepatozyten, was jedoch im Alter von vier bis fünf Wochen wieder vollständig verschwunden war. Des Weiteren konnte auch beim Phänotyp E2 Leberfibrose in der Portalregion beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 1996).

Die Erkenntnisse, die aus AhR-Knockout-Mausmodellen gewonnen werden konnten, weisen darauf hin, dass der Ah-Rezeptor neben seiner Rolle in der Regulierung der Genexpression bestimmter fremdstoffmetabolisierender Enzyme auch die Entwicklung einiger Organe wie Leber, Niere und Milz beeinflusst. Außerdem wird ein Einfluss auf die Ausbildung des Immunsystems diskutiert (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Fujii-Kuriyama und Kawajiri, 2010; Schmidt *et al.*, 1996).

2.3 Fremdstoffmetabolismus

Alle Organismen nehmen täglich aus der Umwelt zahllose Fremdstoffe (Xenobiotika) auf, die sie weder als physiologische Bausteine noch als Energielieferanten verwerten können. Dazu zählen beispielsweise natürlich vorkommende Pestizide und Karzinogene wie Phenole und Aflatoxine, aber auch halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie Dioxine. Da alleine in der täglichen Nahrung viele natürliche Xenobiotika enthalten sind, ist die Möglichkeit einer Gesundheitsgefährdung enorm groß. Um eine Akkumulation dieser meist hydrophoben und gut resorbierbaren Fremdstoffe zu verhindern, benötigt der Körper effiziente Mechanismen zur Ausscheidung dieser Stoffe. Hauptwege der Ausscheidung sind die Niere und Galle. Die Lunge und die Muttermilch stellen eine eher untergeordnete Rolle dar. Der Fremdstoffmetabolismus wandelt in mehreren Phasen lipophile Fremdstoffe so um, dass sie als hydrophile Konjugate aus dem Körper ausgeschieden werden können. Die Leber ist Hauptorgan für die Biotransformation von Xenobiotika in höheren Organismen, aber auch andere Organe wie Darm, Niere und Lunge exprimieren fremdstoffmetabolisierende Enzyme (Aktories *et al.*, 2009; Eisenbrand *et al.*, 2005; Marquardt und Schäfer, 2004).

Unterteilt wird der Fremdstoffmetabolismus in drei Phasen. In Phase I, der metabolischen Funktionalisierungsreaktion, wird zunächst eine funktionelle Gruppe wie z.B. OH, SH oder NH₂ in das Molekül eingefügt. Dabei entstehen meist polarere Metaboliten. An dieser Funktionalisierungsreaktion sind unter anderem die Oxidoreduktasen der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP), Monoaminoxidasen (MAO), Cyclooxygenasen (COX) und Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO) beteiligt (Eisenbrand *et al.*, 2005; Marquardt und Schäfer, 2004). In Phase II, der Konjugationsreaktion, wird der zuvor in Phase I funktionalisierte Metabolit mit einem hydrophilen, endogenen Substrat wie z. B. Glutathion oder Glucuronsäure konjugiert. Durch die Konjugation des Phase I-Metaboliten mit einem hydrophilen Substrat wird in der Regel die Wasserlöslichkeit erhöht und somit die renale Ausscheidung der Substanz erleichtert. An dieser Reaktion sind Transferasen wie die Aminoacyltransferasen (NAT), UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Glutathion-S-transferasen (GST), Methyltransferasen (MT) und die Sulfotransferasen (SULT) beteiligt (Eisenbrand *et al.*, 2005; Marquardt und Schäfer, 2004). In Phase III wird nun der hydrophile Metabolit mit Hilfe von Transportsystemen wie z. B. ABC-Transportern oder löslichen Carriersystemen (SLC) wie Anion-Transport-Polypeptiden (OATP) oder Kation-Transportern (OAT, OCT) aus der Zelle heraustransportiert. Der hydrophile Metabolit gelangt nun in wässrigen Medien wie Gallenflüssigkeit, Blut, Harn und Schweiß zum Ausscheidungsort (Marquardt and Schäfer, 2004; Mizuno *et al.*, 2003).

2.3.1 Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen

Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, auch kurz CYPs genannt, stellen eine Superfamilie von strukturell miteinander verwandten Hämproteinen dar. Sie besitzen eine katalytische Aktivität und sind an einer Vielzahl von Reaktionen der Phase I des Fremdstoffmetabolismus beteiligt. Sie haben Molekulargewicht zwischen 45 und 60 kDa, besitzen alle eine Hämgruppe, unterscheiden sich aber in der Aminosäuresequenz des Proteinanteils (Eisenbrand *et al.*, 2005). Die Nomenklatur der CYP beruht auf der strukturellen Verwandtschaft der einzelnen Enzyme. Zuerst erfolgt eine Einteilung in Familien anhand der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von mindestens 40 % (CYP1, CYP2, CYP3 usw.). Anschließend werden diese Familien weiter in Unterfamilien (Subfamilien), die eine Sequenzidentität von mindestens 50 % aufweisen (CYP1A, CYP1B usw.), unterteilt. Jedes Mitglied der jeweiligen Unterfamilie wird noch mit einer Nummer beschrieben (CYP1A1, CYP1A2 usw.) (Aktories *et al.*, 2009; Wrighton und Stevens, 1992). Die Zahl „450“ in der Bezeichnung Cytochrom P450 beruht auf dem Absorptionsmaximum von 450 nm des reduzierten Cytochrom-Kohlenmonoxid-Komplexes. Wird von humanen Genen gesprochen, so wird die Großschreibung (z. B. CYP1A1) verwendet, wird von Mäuse und Drosophila Genen gesprochen, so findet die Kleinschreibung (z. B. Cyp1a1) Verwendung

(Nelson *et al.*, 1996). In Eukaryoten liegen CYPs im endoplasmatischen Retikulum als membrangebundene Enzyme in einem Komplex mit der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase vor. Die verschiedenen Enzyme kommen in verschiedenen Geweben und Zellen in unterschiedlichen Mengen vor, die zudem von der Spezies, vom Alter, vom Ernährungs- und Induktionsstatus abhängt (Eisenbrand *et al.*, 2005). Sie sind am Abbau und an der Synthese von vielen endogenen Steroiden, Vitaminen und Fettsäuren beteiligt. Die Metabolisierung von exogenen Fremdstoffen wie Arzneimitteln, Umweltgiften und Karzinogenen gehört ebenfalls zum Aufgabenbereich der CYPs. Die wichtigsten Vertreter für den Fremdstoffmetabolismus sind die Familien CYP1 bis CYP4, die mehr als 90 % der erhältlichen Therapeutika metabolisieren (Marquardt und Schäfer, 2004; Monostory und Pascussi, 2008).

Die grundlegende Reaktion, die durch Cytochrom P450-haltige Monooxygenasen katalysiert wird, beruht auf der Aktivierung molekularen Sauerstoffs unter Verbrauch von NADPH. Dabei wird ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut, wobei das zweite Sauerstoffatom mit Hilfe der Oxidation von NADPH zu Wasser reduziert wird (Eisenbrand *et al.*, 2005). Die Bruttogleichung ist in Abbildung 7 dargestellt.

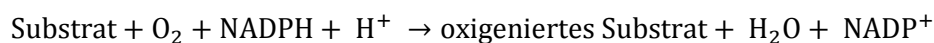


Abbildung 7: Bruttogleichung der Monooxygenase-Reaktion (nach Eisenbrand *et al.* 2005)

Abhängig vom Substrat resultieren aus dieser Reaktion aliphatische und aromatische Hydroxylierungen, Epoxidierungen olefinischer und aromatischer Doppelbindungen, die oxidative Desalkylierung von *N*-, *O*- und *S*-Alkylverbindungen, die oxidative Desaminierung und die Oxidation von Thioethern und Aminen zu Sulfoxiden und Hydroxylaminen (Marquardt und Schäfer, 2004; Mutschler *et al.*, 2008). Der Mechanismus dieser Monooxygenasereaktion lässt sich in mehreren Schritten darstellen. In Abbildung 8 ist dieser mehrstufige Mechanismus der Monooxygenierung von Fremdstoffen durch CYPs vereinfacht dargestellt.

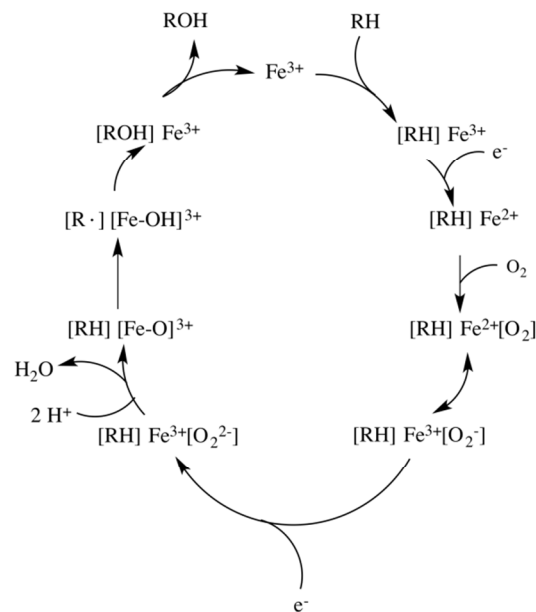


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des mehrstufigen Mechanismus der Monooxygenierung von Fremdstoffen durch Cytochrom P450-Enzyme (nach Eisenbrand *et al.* 2005)

Im ersten Schritt lagert sich das lipophile Substrat an das aktive Zentrum des CYP an. Im nächsten Schritt wird der Enzym-Substrat-Komplex reduziert. Dabei wird das Fe^{3+} des Häms durch eine Elektronenübertragung mit Hilfe der assoziierten NADPH-Cytochrom P450-Reduktase zu Fe^{2+} reduziert. Dieses nun reduzierte Fe^{2+} im Hämverband ist nun fähig molekularen Sauerstoff zu binden, wodurch ein $[\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-]$ -Komplex entsteht. Nach der Übertragung eines weiteren Elektrons vom NADPH durch die NADPH-CYP-Reduktase entsteht der hochreaktive $[\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{2-}]$ -Komplex. Im aktiven Zentrum liegt nach Aufnahme des zweiten Elektrons der Sauerstoff formal in der Oxidationsstufe des Peroxides vor, aus dem nach Aufnahme von zwei Protonen Wasser abgespalten wird und ein Ferryl-Sauerstoff-Komplex $[\text{Fe-O}]^{3+}$ entsteht. Das verbleibende Sauerstoffatom des $[\text{Fe-O}]^{3+}$ -Komplexes wird an eine Doppelbindung des Substrates angelagert oder in eine C-H-Bindung eingeschoben. Im letzten Schritt löst sich das oxygenierte Substratmolekül ab, da es durch H_2O verdrängt wird und das Enzym liegt nun wieder im Ausgangszustand vor (Eisenbrand *et al.*, 2005; Marquardt und Schäfer, 2004). Diese Reaktion läuft nicht nur in intakten Zellen ab, sondern kann auch *in vitro* in Mikrosomen durchgeführt werden.

2.3.1.2 Cyp1 Familie

In Mäusen besteht die Cyp1 Familie aus den Enzymen Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1. Sie sind in der Lage sowohl polyzyklische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[*a*]pyren als auch heterozyklische und aromatische Arylamine metabolisch zu Kanzerogenen zu aktivieren. Das

Enzyme Cyp1a1 wird hauptsächlich in außerhepatischen Geweben wie Lunge, Niere und Plazenta konstitutiv exprimiert und nur in geringem Maße in den Lebern von Mäusen, Ratten und Menschen. CYP1A2/Cyp1a2 wird ausschließlich in der Leber konstitutiv exprimiert und stellt mit 13 % der gesamten CYP-Menge eines der wichtigsten CYP-Vertreter in der Leber dar. Cyp1b1 wird in Herz, Lunge, Leber, Niere und Prostata konstitutiv exprimiert. In Tumorzellen wird es dagegen im Vergleich zum Tumornahen normalen Gewebe verstärkt exprimiert (Martignoni *et al.*, 2006).

Cyp1-Enzyme können durch polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie TCDD, dioxin-artige PCBs und andere dioxin-artige Verbindungen induziert werden. Dabei bindet z.B. TCDD als Ligand an den AhR und aktiviert den AhR-ARNT-Signalweg (Honkakoski and Negishi, 2000; Martignoni *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 1988; Zeiger *et al.*, 2001). In Abbildung 9 ist die die Aktivierung des AhR-ARNT-Signalweges schematisch dargestellt. In Abwesenheit eines Liganden liegt der AhR im Zytosol gebunden an die Proteine Hsp90 (Hitzeschockprotein), XAP2 (*hepatitis b virus X-associated protein 2*) und p23 (Ko-Chaperon) inaktiv vor. Bindet nun ein Ligand wie TCDD an den AhR, transloziert der AhR/Ligand-Komplex nach Abspaltung von XAP2 in den Zellkern. Dort dimerisiert er nach Dissoziation der beiden Hsp90-Proteine sowie von p23 mit ARNT und bildet ein Heterodimer.

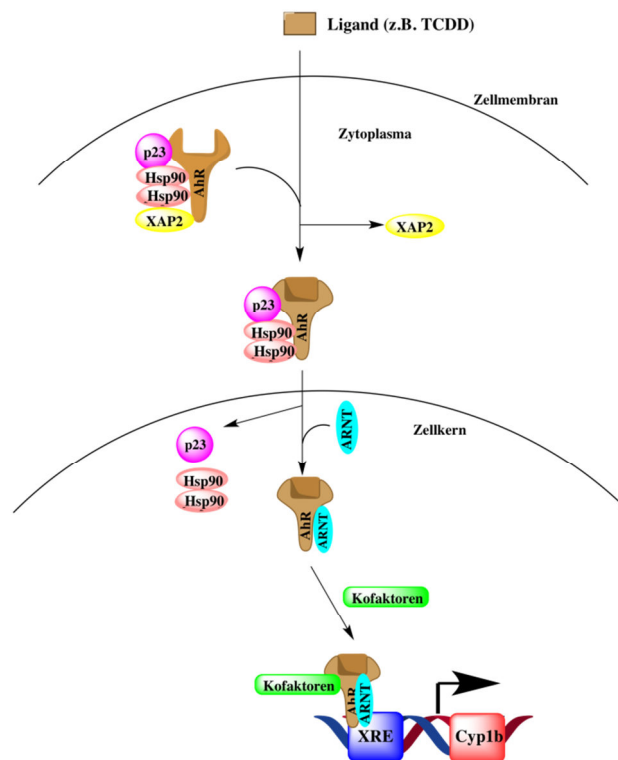


Abbildung 9: Schematische Darstellung der AhR-Signaltransduktion (nach Denison *et al.*, 2011)

Der Ligand/AhR/ARNT-Komplex rekrutiert Kofaktoren wie CBP/p300, SCR-1 oder NCoA2/GRIP1/TIF2 und bindet nun als aktivierter Transkriptionsfaktor an spezifische DNA-Bindungsstellen, den sogenannten *xenobiotic-responsive elements* (XRE). Durch die Bindung an die XREs induziert der Ligand/AhR/ARNT-Komplex die Transkription einer Reihe verschiedener Gene wie z.B. Cyp1b1 (Denison *et al.*, 2002; Fujii-Kuriyama und Kawajiri, 2010; Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003).

2.3.1.3 Cyp2b-Subfamilie

Die Cyp2b-Subfamilie besteht in der Maus aus den Enzymen Cyp2b9, Cyp2b10 und Cyp2b13. Cyp2b9 wird nur in der weiblichen Mausleber exprimiert, während Cyp2b10 in beiden Geschlechtern vorwiegend in Geweben wie Leber, Lunge, Niere, Duodenum, Ileum und Dickdarm exprimiert wird (Martignoni *et al.*, 2006; Renaud *et al.*, 2011). Cyp2b-Enzyme katalysieren die Hydroxylierung einer Vielzahl von Xenobiotika und Steroiden. Viele exogene Stoffe wie z.B. industrielle Lösungsmittel, Babiturate wie Phenobarbital und nicht dioxin-artige PCBs sind starke Induktoren der Cyp2b-Enzyme. Phenobarbital (PB) ist der Prototyp der Xenobiotika, welche die Cyp2b-Enzyme durch Aktivierung des CAR (*constitutive androstane receptor*)-Signalwegs induzieren (Honkakoski und Negishi, 2000; Honkakoski *et al.*, 1996; Kawamoto *et al.*, 1999). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass PXR (*pregnane X receptor*)-Liganden wie Rifampicin in Mäusen Cyp2b-Enzyme induzieren, was auf einen Cross-Talk von CAR und PXR hindeutet (Martignoni *et al.*, 2006). CAR reguliert Gene wie Sulfotransferasen, Glucuronosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen, die vorwiegend in metabolischen Detoxifizierungsprozessen involviert sind (Assem *et al.*, 2004; Swales und Negishi, 2004; Ueda *et al.*, 2002).

In Abbildung 10 ist die indirekte Aktivierung von CAR durch einen Aktivator oder die direkte Aktivierung durch einen Liganden schematisch dargestellt. In Abwesenheit eines Liganden liegt CAR an die Proteine Hsp90 und CCRP (*cytoplasmic CAR retention protein*) gebunden vor. Durch einen Aktivator wie z. B. Phenobarbital (PB) kann CAR indirekt aktiviert werden. Ist ein Aktivator wie Phenobarbital vorhanden wird die Proteinphosphatase 2A rekrutiert und diese dephosphoryliert CAR. Dadurch dissoziieren Hsp90 und CCRP von CAR ab und CAR transloziert daraufhin in den Zellkern. Im Zellkern bildet CAR ein Heterodimer mit RXR (*retinoid X receptor*). Der CAR-RXR-Komplex bindet mit Hilfe von Kofaktoren wie SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), GR-interacting protein 1 (*glucocorticoid receptor-interacting protein 1*) an PBREM (*PB-responsive enhancer module*), wodurch die Transkription der Cyp2b-Enzyme induziert wird.

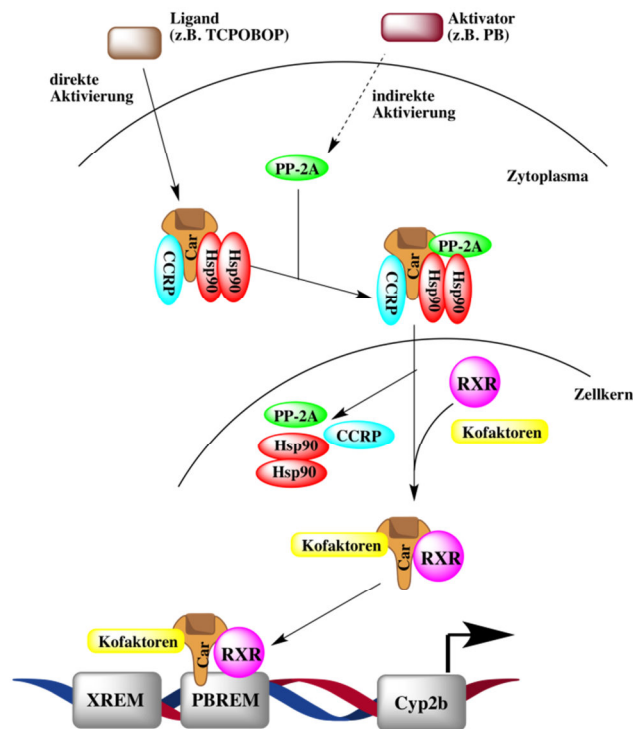


Abbildung 10: Schematische Darstellung der indirekten Aktivierung von CAR durch einen Aktivator oder der direkten Aktivierung durch einen Liganden (nach Kawamoto *et al.* 1999, Moore *et al.* 2000, Swales und Negishi 2004, Timsit und Negishi 2007)

PB = Phenobarbital
 TCPOBOP = 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene

CAR kann auch durch Bindung eines Liganden wie TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzol) direkt aktiviert werden. Nach Bindung des Liganden an CAR wird ebenfalls die Proteinphosphatase 2A rekrutiert und diese dephosphoryliert CAR. Die weitere Signaltransduktion verläuft wie bei der Aktivierung von CAR durch einen Aktivator (Kawamoto *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000; Swales und Negishi, 2004; Timsit und Negishi, 2007).

2.3.1.4 Cyp3a-Subfamilie

Die Cyp3a Subfamilie besteht in Mäusen aus den Enzymen Cyp3a11, Cyp3a13, Cyp3a16, Cyp3a25, Cyp3a41, Cyp3a44, Cyp3a57 und Cyp3a59. In Mäusen werden die Cyp3a Enzyme vorwiegend in Leber und Darm exprimiert. Die beiden Enzyme Cyp3a41 und Cyp3a44 kommen hauptsächlich in den Lebern weiblicher Mäuse vor (Sakuma *et al.*, 2002).

Cyp3a-Enzyme sind an der Metabolisierung von endogenen Substraten wie Steroiden (z. B. Testosteron, Progesteron, Androstendion und Cortisol) und Gallensäuren (z. B. Litocholsäure) beteiligt. Außerdem sind sie in den Fremdstoffmetabolismus von mehr als 50 % aller

gebräuchlichen Medikamente wie Antimykotika, Kontrazeptiva, Makrolidantibiotika und Antidepressiva involviert (Goodwin *et al.* 2002, Kliewer 2003, Renaud *et al.* 2011).

Induziert werden Cyp3a-Enzyme durch ein breites Spektrum von Substanzen wie Antibiotika (z. B. Rifampicin), polychlorierte Biphenyle (PCBs) oder Antikonvulsiva (z. B. Phenytoin). Der stärkste Induktor für die Expression von humanem CYP3A4 ist Rifampicin, ein bakterizides Antibiotikum, das bei Tuberkulose und Lepra eingesetzt wird (Goodwin *et al.*, 2002). In Nagern dagegen stellt Rifampicin einen wesentlich schlechteren Induktor dar. Hierbei erwies sich unter anderem das Glucocorticoid Dexamethason als guter Induktor der Cyp3a44-Expression (Bhadhprasit *et al.*, 2007). Die durch Antibiotika wie Rifampicin induzierte erhöhte Transkription von humanem CYP3A4 beschleunigt den Abbau von Wirkstoffen in Kontrazeptiva und vermindert so ihre Wirkung (Zachariasen, 1994). Inhibitoren der CYP3A4-Transkription sind unter anderem Erythromycin (Antibiotikum), Ketoconazol und Itraconazol (beides Antimykotika) oder Bergamottin (Furocumarin), das beispielsweise im Saft von Grapefruits vorkommt (Gibbs *et al.*, 1999; He *et al.*, 1998).

In Abbildung 11 ist die Aktivierung des PXR durch einen Liganden schematisch dargestellt. Der Mechanismus der Cyp3a-Transkription verläuft über die Aktivierung des PXR.

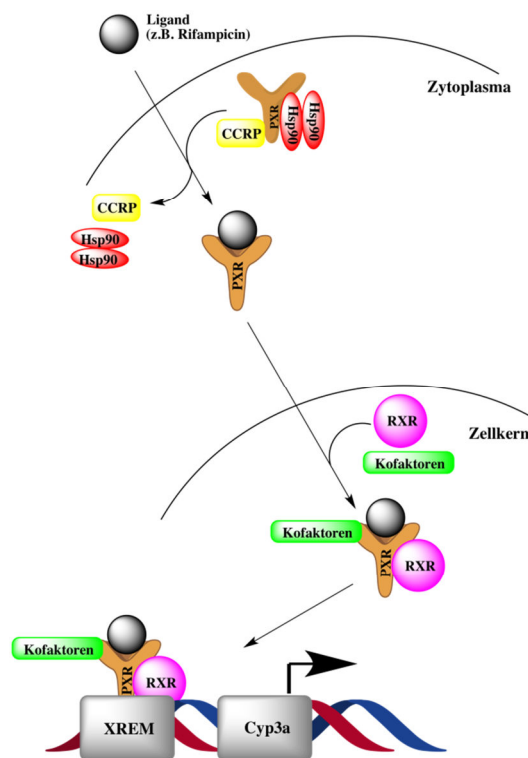


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aktivierung von PXR durch Rifampicin (nach Goodwin *et al.* 2002, Timsit und Negishi 2007)

Ein Ligand wie Rifampicin bindet an den im Zytoplasma an weitere Proteine (Hsp90 und CCRP) gebundenen PXR. Dadurch dissoziieren die Proteine Hsp90 und CCRP ab und der Ligand/PXR-Komplex transloziert in den Zellkern (Goodwin *et al.* 2002).

Dort dimerisiert der Komplex mit dem RXR zu einem Heterodimer. Das Ligand/PXR-RXR-Heterodimer bindet mit Hilfe von wie SRC-1 oder TIF2/GRIP1 an Kernpromotorelemente (ER6 und DR3) innerhalb der XREM (*xenobiotic responsive enhancer module*) des Cyp3a-Gens. Durch die Bindung wird die Transkription von Cyp3a induziert (Goodwin *et al.* 2002, Timsit und Negishi 2007). PXR reguliert die Expression von Genen, die in den Fremdstoffmetabolismus involviert sind wie Sulfotransferasen, Glucuronosyltransferasen und Cyp3a-Enzyme. Aber auch die Isoenzyme der Cyp2b- und Cyp2c-Subfamilie werden durch den PXR reguliert, allerdings wesentlich schwächer (Goodwin *et al.* 2002).

2.4 Vitamin-D-Rezeptor

2.4.1 Vorkommen und Struktur

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol), ist die biologisch aktive Form des Vitamin D₃ und ist ein wichtiger Regulator von Zellwachstum, -differenzierung und -tod. Die Wirkung von Calcitriol in der Zelle wird durch einen intrazellulären Rezeptor, den Vitamin-D-Rezeptor (VDR), reguliert (Monostory und Pascussi, 2008). Der VDR ist ein Mitglied der Steroidhormon-Rezeptor-Superfamilie und wirkt als ligandabhängiger Transkriptionsfaktor. Sein Molekulargewicht beträgt zwischen 48 und 50 kDa. In Abbildung 12 sind die funktionellen Domänen des VDR schematisch dargestellt. Das aus 427 Aminosäuren bestehende VDR-Protein enthält eine Liganden/Hormonbindungsdomäne (*ligand binding domain/LBD*), eine DNA-Bindungsdomäne (*DNA binding domain/DBD*) sowie zwei Transaktivierungsdomänen (AF-2 und E1). Einige Regionen (E1, E2, E3 und neun *heptad repeats*) innerhalb dieser Liganden- und DNA-Bindungsdomäne sind wichtige Kopplungsstellen für die Dimerisierung mit dem RXR. Die Transaktivierungsdomänen AF-2 und E1 scheinen als Kopplungsstelle für die Interaktion mit transkriptionellen Korepressoren und -aktivatoren zu dienen (Dusso *et al.*, 2005; Issa *et al.*, 1998).

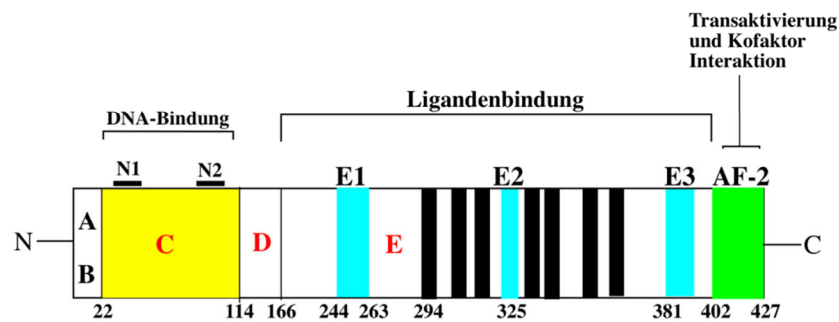


Abbildung 12: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des VDR (nach Issa *et al.* 1998)

A, B: N-Terminale Domäne

C: DNA-Bindungsdomäne

E: Ligandenbindungsdomäne

N1, N2: Kernlokalisierungssequenzen

AF-2, E1: Transaktivierungsdomänen und Kofaktor Interaktion

E1, E2 (Überlappung mit *heptad repeat* 4), E3 (Überlappung mit *heptad repeat* 9) und *heptad repeats* (schwarze Felder): Kopplungsstellen für Dimerisierung mit RXR

Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich am N-Terminus, während die Hormonbindungsdomäne sich am C-terminalen Ende befindet. Der VDR bindet mit hoher Selektivität und Affinität den Liganden Calcitriol. Die Affinität zu anderen Vitamin D-Metaboliten ist deutlich geringer. Der Liganden-gebundene VDR ist im Zellkern lokalisiert, während der „freie“, unbesetzte VDR im Zytoplasma vermutet wird (Klopot *et al.*, 2007). Der VDR wird nicht nur in den „klassischen“ Zielorganen wie Niere, Knochen und Darmschleimhaut exprimiert, sondern auch in einigen Mesenchym- und Epithelzellen sowie Leukämiezellen und einigen malignen Zelltypen (Haussler *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2006).

2.4.2 Signaltransduktion

In Abbildung 13 ist die Aktivierung des VDR durch Calcitriol schematisch dargestellt. In Abwesenheit eines Liganden liegt der VDR inaktiv an ein Hsp90-Protein gebunden vor. Bindet nun ein Ligand wie Calcitriol, das durch das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) in den Zellkern transportiert wurde, an den VDR dissoziiert Hsp90 ab (Issa *et al.*, 1998; Rachez und Freedman, 2000). Nach anschließender Phosphorylierung des VDR dimerisiert dieser mit dem RXR und bildet ein Heterodimer. Durch die Dimerisierung mit dem RXR kommt es zu einer Konformationsänderung im Bereich der ligandenabhängigen Transaktivierungsdomäne AF-2 (*activation function* 2) am C-terminalen Ende. Diese dreidimensionale Strukturänderung ist wichtig für die Interaktion der Transaktivierungsdomäne mit nukleären Koaktivatoren (Issa *et al.*, 1998; Rachez und Freedman, 2000). Koaktivatoren sind z. B. die p160 Koaktivatoren SRC-1, SRC-2, und SRC-3 sowie der Koaktivator-Komplex DRIP (*vitamin D3 receptor*

interacting protein) und das VDR-interagierende Protein TRAP (*thyroid receptor activating protein*) (Christakos *et al.*, 2006). Der VDR/RXR-Komplex bindet mittels DBD an VDRE (*vitamin D responsive elements*) in den Promotoren der VDR-Zielgene. Die DNA-Bindungsstelle des VDR beinhaltet zwei klassische Zinkfinger-Domänen (Rachez und Freedman, 2000).

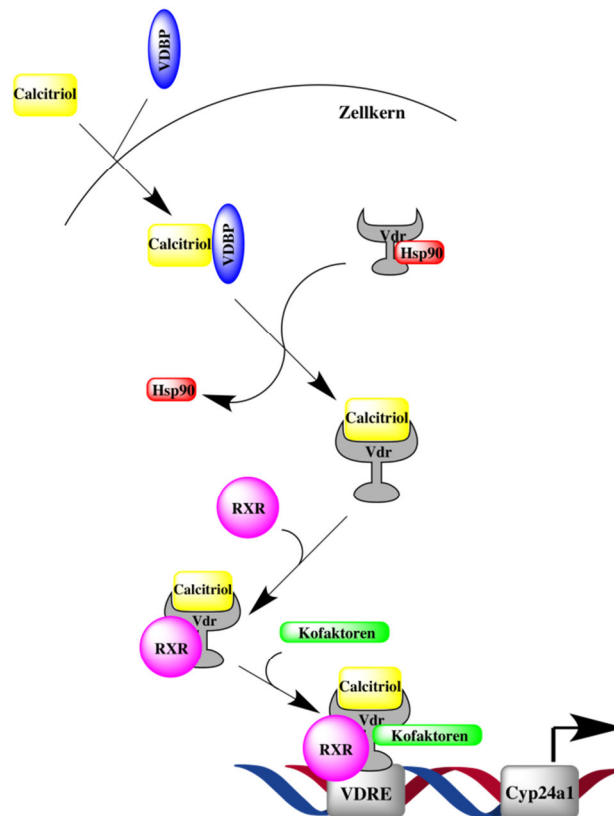


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Aktivierung des VDR durch Calcitriol (nach Issa *et al.* 1998, Rachez und Freedman 2000)

Diese Zinkfingerdomänen weisen eine hohe Affinität für VDREs in den Promotoren auf. Entscheidend für die Interaktion sind die jeweiligen Zell- und Promotor-spezifischen Ko-regulatoren (Rachez und Freedman, 2000). Die Aktivität des Rezeptor-Liganden-Komplexes hängt von der zellspezifischen Expression des VDBP ab. VDBP reguliert den Transport des Liganden in den Zellkern und beeinflusst damit indirekt die Halbwertszeit des VDR, da die Ligandenbindung den VDR vor Ubiquitinierung und Abbau im Proteasom schützt (Masuyama und MacDonald, 1998).

Der VDR kann sowohl eine Geninduktion als auch eine Gensuppression bewirken. VDR-Zielgene kodieren hauptsächlich für Proteine, die die Calcium-Homöostase regulieren, wie z. B. die Epithel-Calcium-Kanäle TRPV5 und 6 (*transient receptor potential vanilloid-type family member 5/6*), die der zellulären Calcium-Aufnahme dienen oder die basolaterale Plasmamembran Kalzium-ATPase (PMCA1), die Calcium aus den Zellen pumpt. Ein weiteres VDR-Zielgen ist Osteocalcin, dessen Synthese in Osteoblasten durch Calcitriol

induziert wird und das ein Bestandteil der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix ist (van de Peppel und van Leeuwen, 2014). Weitere VDR regulierte Gene sind *Cyp27b1* (1 α -Hydroxylase) und *Cyp24a1* (24-Hydroxylase), die in die Biosynthese und den Abbau von Calcitriol involviert sind und dadurch die Calcium-Homöostase indirekt regulieren (Dusso *et al.*, 2005).

2.4.3 VDR und VDR-Zielgene in Tumoren

Calcitriol zeigt Antitumoraktivität in murinen und humanen squamösen Zellen sowie an Lunge-, Pankreas-, Prostata- und Myelom-Model Systemen. Es induziert Apoptose in Zellen durch Hochregulierung des proapoptotischen Moleküls MEKK-1. Außerdem induziert es einen G₀/G₁-Zellzyklusarrest durch Modulation der Cyclin-abhängigen Kinasen p21 und p27 und führt zu einer Verminderung der für das Zellüberleben nötigen Kinasen Phospho-Erk (p-Erk) und Phospho-Akt (p-Akt). Calcitriol bewirkt die Spaltungen von Kaspase 3, Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MEK) (Johnson *et al.*, 2006). Die Ergebnisse weiterer Studien an Zelllinien beschreiben einen durch Calcitriol vermittelten Zellzyklusarrest an den G₁/S- und G₂/M-Checkpoints durch erhöhte Stabilität der Kinase p27 und durch Hochregulierung von GADD45 (*growth arrest and DNA damage-inducible gene*). Die durch Calcitriol-induzierte Apoptose in Ovarialkarzinom-Zellen wird ebenfalls durch eine verminderte Stabilität der Telomerase-mRNA bewirkt (Zhang *et al.*, 2006).

Die wachstumshemmenden und antiproliferativen Effekte von Calcitriol werden über den VDR vermittelt. Daher ist bei Krebstherapien mit Calcitriol bzw. dessen Analoga die Höhe der VDR-Expression für die Sensitivität eines Karzinoms relevant (Welsh *et al.*, 2002). Studien haben gezeigt, dass hohe Calcitriolkonzentrationen einen wachstumshemmenden Effekt auf die maligne Ovarialzelllinie OVCAR-3 haben, wenn diese den VDR exprimieren (Miettinen *et al.*, 2004). Der VDR wird in 43-50 % aller Ovarialkarzinome exprimiert (Ahonen *et al.*, 2000). In Untersuchungen zur Expression von VDR und *Cyp24a1* in Tumoren unterschiedlicher Organe konnte in Kolon-, Lungen-, und Ovarialkarzinomen eine signifikant erhöhte *Cyp24a1*-Expression nachgewiesen werden, während eine erhöhte VDR-Expression nur in Ovarialkarzinomen festgestellt wurde. Im Vergleich zum Ovarialkarzinom war das Level an VDR-mRNA in gesundem Ovargewebe sehr niedrig. In 10 von 13 gesunden Gewebeproben konnte keine *Cyp24a1*-mRNA nachgewiesen werden (Anderson *et al.*, 2006). Das Ovar unterscheidet sich von anderen untersuchten Organen, da im Ovarialkarzinom die VDR- und *Cyp24a1*-Expression miteinander korreliert während im Kolon-, Lungen- und Oropharynxkarzinom eine inverse Korrelation zwischen der Expression von *Cyp24a1* und VDR beschrieben wird (Anderson *et al.*, 2006; Mimori, 2004).

Eine erhöhte Genexpression von *Cyp24a1* wurde auch in Mammakarzinomen beobachtet. Der Begriff Onkogen wird teilweise auch für das Enzym *Cyp24a1* verwendet, da es die

antiproliferativen und zelldifferenzierenden Effekte von Calcitriol durch einen erhöhten Abbau reduziert (Albertson *et al.*, 2000). In Studien zum Mammakarzinom wurde eine signifikant erhöhte *Cyp27b1*-Expression in malignen Zellen im Vergleich zu benignen Zellen beschrieben. Außerdem wird vermutet, dass Veränderungen in der lokalen Bildung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ möglicherweise in die Tumorgenese von Brustkrebs involviert ist (Friedrich *et al.*, 2006).

In Klarzellkarzinomen in den Nieren konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von *Cyp27b1* und *Cyp24a1* beobachtet werden. Wobei die *Cyp24a1*-Expression signifikant höher war als die *Cyp27b1*-Expression. Daher wird vermutet, dass die Hochregulierung der Genexpression des katabolisierenden *Cyp24a1* und des synthetisierenden *Cyp27b1* zu einer Dysregulation des Vitamin D Stoffwechsels in Klarzellkarzinomen führt und zu dessen Pathogenese beiträgt (Urbschat *et al.*, 2013).

2.5 Protoonkogen c-Myc

Das Protoonkogen c-Myc wurde erstmals 1982 von Vennstrom *et al.* isoliert sowie charakterisiert und stellt die zelluläre sowie homologe Form des viralen Gens v-Myc dar (Vennstrom *et al.*, 1982). v-Myc wurde erstmals aus dem Myelocytomatose-Virus MC29 isoliert. Das Virus MC29 zählt zu den aviären Retroviren, die eine Vielzahl an Neoplasien, darunter Karzinome, Sarkome sowie Myelocytomatose auslösen. Die Bezeichnung „Myc“ ist von der Krankheit Myelocytomatose abgeleitet. Die transformierenden Eigenschaften des Virus MC29 werden dem Genprodukt des Onkogens v-Myc zugeschrieben (Alitalo *et al.*, 1983; Sheiness und Bishop, 1979). c-Myc gehört zu den am häufigsten aktivierten Onkogenen und es wird vermutet, dass es in 20 % aller humanen Krebsarten involviert ist (Dang *et al.*, 2006; Nesbit *et al.*, 1999). Ein klassisches Beispiel der Dysregulation von c-Myc durch Translokation stellt das Burkitt-Lymphom dar. Bei dieser malignen Neoplasie der B-Lymphozyten erfolgt die Translokation von c-Myc zwischen seinem normalen Locus auf Chromosom 8 (8q24) und eines der Chromosomen 2, 14 oder 22, die die Immunglobulin-Gene enthalten. Diese Translokation führt zu einer gesteigerten Expression der normalerweise streng kontrollierten *c-Myc* Expression und beeinflusst die Stabilität des Transkripts bzw. die Effizienz der Translation (Dalla-Favera *et al.*, 1982).

Der direkte Zusammenhang zwischen *c-Myc* Expression und Tumorentstehung konnte in Tiermodellen gezeigt werden. So konnte z.B. in transgenen Mäusen durch gezielte *c-Myc* Überexpression in Brustdrüsen Mammakarzinome induziert werden (Schoenenberger *et al.*, 1988).

2.5.1 Regulation der Transkription

Das Protoonkogen *c-Myc* gehört zur Gruppe der „immediate early response“ Gene, die nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Serum in verschiedenen Zelllinien innerhalb weniger Minuten induziert werden und oftmals nach ca. zwei Stunden ihre maximale Transkriptionsrate erreichen (Kelly *et al.*, 1983; Lau and Nathans, 1987). Die Expression von *c-Myc* kann auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden wie der Transkription, Prozessierung und Halbwertszeit der mRNA sowie der Translation und Halbwertszeit des *c-Myc*-Proteins. Beeinflusst wird die *c-Myc*-Expression dabei unter anderem von Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF, durch Interferone, Interleukine, Retinoide, Steroidhormone wie Vitamin D und Östrogen. Die dadurch aktivierten Signalwege umfassen den MAP-Kinase-Weg, JAK/STAT, Ras, IFN- γ , PI-3K, Fas, Wnt, TGF- β , NF- κ B- sowie E2F-aktivierende Signalwege (Levens, 2010; Liu und Levens, 2006; Meyer und Penn, 2008). In Abbildung 14 ist die Regulation der *c-Myc*-Transkription und posttranslationale Modifikation schematisch dargestellt.

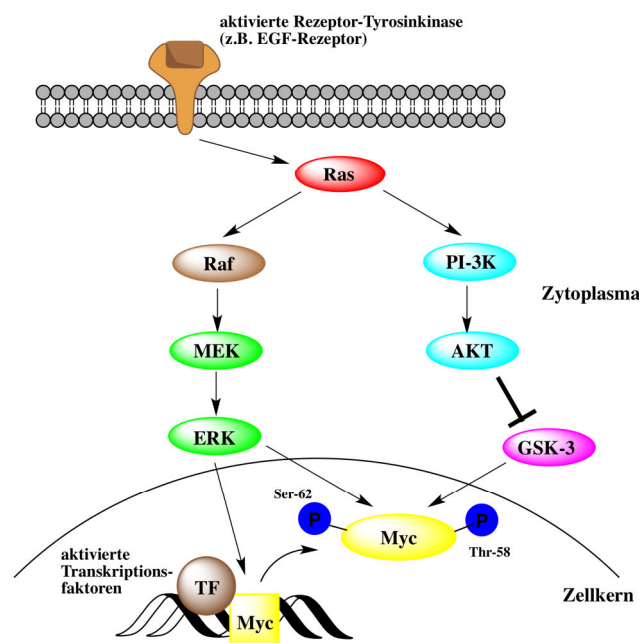


Abbildung 14: Regulation der *c-Myc*-Transkription und posttranslationale Modifikation (nach Sears *et al.* 2000, Meyer und Penn 2008)

Durch Bindung eines Wachstumsfaktors wie EGF an den EGF-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von Ras und einer Steigerung der Aktivität von Raf/ERK-Kinasen. Dies wiederum mündet in der Induktion der *c-Myc*-Expression (Sears *et al.*, 2000).

Nach der Translation des *c-Myc*-Proteins wird es durch eine ERK-vermittelte Phosphorylierung an Serin-62 stabilisiert und dadurch seine Halbwertszeit verlängert. Das

phosphorylierte Serin-62 dient als Signal zur Phosphorylierung von Threonin-58, die durch das Enzym Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) katalysiert wird. Die Phosphorylierung von Threonin-58 dient als Signal zum Abbau von c-Myc und ist abhängig von der Phosphorylierung an Serin-62. Der durch Wachstumsfaktoren ebenfalls aktivierte PI-3K/AKT-Signalweg hemmt allerdings die Aktivierung von GSK-3, sodass die Phosphorylierung von Threonin-58 zunächst ausbleibt. Erst nach Abklingen der proliferativen Signale und der Aktivität von Ras und AKT wird GSK-3 aktiv und führt die Phosphorylierung an Threonin-58 aus. Erst daraufhin wird c-Myc ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (Sears *et al.*, 2000).

2.5.2 Struktur und funktionelle Domänen des c-Myc-Proteins

Das c-Myc-Protein ist ein nukleäres Phosphoprotein und gehört zu den Transkriptionsfaktoren der basic helix-loop-helix/Leucin-Zipper-Familie (bHLH-Zip) (Landschulz *et al.*, 1988; Meyer und Penn, 2008; Murre *et al.*, 1989). In Abbildung 15 ist die Proteinstruktur mit den funktionellen Domänen schematisch dargestellt. Der *N*-Terminus beinhaltet sowohl eine für die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie benötigte Transaktivierungsdomäne (TAD) als auch ein Kernlokalisierungssignal (NLS).



Abbildung 15: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des c-Myc-Proteins (nach Meyer und Penn 2008)

- I, II, IIIa, IIIb, IV: Myc-Boxen I-IV
- BR: basische Region
- C: C-Terminus
- HLH-LZ: helix-loop-helix/Leucin-Zipper-Domäne
- N: N-Terminus
- NLS: Kernlokalisierungssequenz
- TAD: Transaktivierungsdomäne

Daneben sind in diesem Bereich konservierte Motive enthalten, die sogenannten Myc-Boxen (I, II, IIIa/b und IV). Myc-Box II ist die wichtigste Region innerhalb der Transaktivierungsdomäne, da sie für die Bindung von c-Myc an Kofaktoren für die Transaktivierung und Hemmung der meisten c-Myc Zielgene notwendig ist. Am C-terminalen Ende des Proteins sind eine Region basischer Aminosäuren (BR) und die helix-loop-helix/Leucin-Zipper-Domäne (bHLH-Zip) lokalisiert. Dieser Bereich ist für die DNA-Bindung sowie die Dimerisierung mit weiteren Proteinen der bHLH-Zip-Familie wichtig (Cole und Cowling, 2008; Dang und Lee, 1988; Meyer und Penn, 2008; Murre *et al.*, 1989).

2.5.3 Signaltransduktion und c-Myc-Zielgene

Der Transkriptionsfaktor c-Myc wird mit der Regulation der Expression von ca. 10-15 % aller Gene in Verbindung gebracht. Zu diesen zählen vor allem Gene, die bei der Regulation des Zellzyklus, des Metabolismus, der Synthese von Ribosomen und Proteinen sowie der mitochondrialen Funktion beteiligt sind. c-Myc kann aber auch die Expression von Genen hemmen, die Zellzyklusarrest und Adhäsion von Zellen bewirken (Dang *et al.*, 2006). Außerdem treibt c-Myc gleichzeitig die Proliferation von Zellen voran, hemmt Differenzierungsvorgänge und fördert die Zelltransformation. Dabei werden Gene wie Cyclin B1 und E sowie CDK4 (Cyclin-abhängige Kinase 4) beeinflusst, deren Proteine an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Ebenfalls kommt es zur Hemmung der Genexpression der CDK-Inhibitoren p21 und p15^{INK4b} (Coller *et al.*, 2000; Menssen and Hermeking, 2002; Staller *et al.*, 2001). Durch die c-Myc-induzierte Steigerung der Proliferation von Zellen herrscht ein erhöhter Proteinbedarf, weshalb weitere Zielgene, die ribosomale RNAs und Proteine kodieren, verstärkt transkribiert werden. Dadurch wird die Biogenese von Ribosomen gesteigert, sodass eine erhöhte Proteinbiosynthese erfolgen kann (Kim *et al.*, 2000). Des Weiteren reguliert c-Myc verstärkt Gene vieler Enzyme, die in wichtige Stoffwechselwege involviert sind, wie z. B. der Glykolyse. Die erhöhte Genexpression der Enolase, der Lactat-Dehydrogenase A, der Phosphofruktokinase und des Glukose-Transporters I (GLUT 1) führt zu einer verstärkten Aufnahme von Glukose und einer deregulierten Glykolyserate (Osthus *et al.*, 2000). Darüber hinaus beeinflusst c-Myc den Eisen-Metabolismus durch die Regulation des Transferrin-Rezeptors. Dadurch kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Eisen-Konzentration (Coller *et al.*, 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass c-Myc eine Vielzahl von Genen aus unterschiedlichen Bereichen reguliert. Dies spiegelt die komplexen physiologischen Effekte von c-Myc wider, die nicht durch die Regulation einzelner Zielgene erklärt werden können (Coller *et al.*, 2000).

In Abbildung 16 ist die Signaltransduktion durch c-Myc und das c-Myc/Max/Mad-Netzwerk schematisch dargestellt. Das c-Myc-Protein kann entweder als Aktivator oder Repressor der Transkription wirken. Hierfür dimerisiert es mit Hilfe der C-terminalen bHLH-Zip-Domäne mit Max (*Myc-associated factor-X*), einem weiteren Protein der bHLH-Zip-Familie. Max liegt im Gegensatz zu c-Myc, welches als Reaktion der Zelle auf proliferative Signale hauptsächlich *de novo* synthetisiert wird und relativ schnell wieder abgebaut wird (Halbwertszeit von 20-30 min), als stabiles Protein in relativ konstanten Konzentrationen vor (Blackwood *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu Max kann c-Myc keine Homodimere bilden, sondern nur Heterodimere mit Max. Die Dimerisierung mit Max ist für die biologischen Funktionen von c-Myc notwendig (Amati *et al.*, 1993, 1992). Nach der Dimerisierung bindet der c-Myc-Max-Proteinkomplex an sogenannte E-Box Sequenzen (5'-CACGTG-3') in der

Promotorregion von Zielgenen. Diese Bindung wird durch Interaktionen basischer Aminosäuren mit dem Phosphodiesterückgrat der Nucleinsäuren weiter stabilisiert (Lüscher und Larsson, 1999). Die c-Myc-vermittelte Aktivierung der Transkription wird auf gesteigerte Histon-Acetylierung und der damit einhergehende einer offeneren Chromatinstruktur (Euchromatin) zurückgeführt.

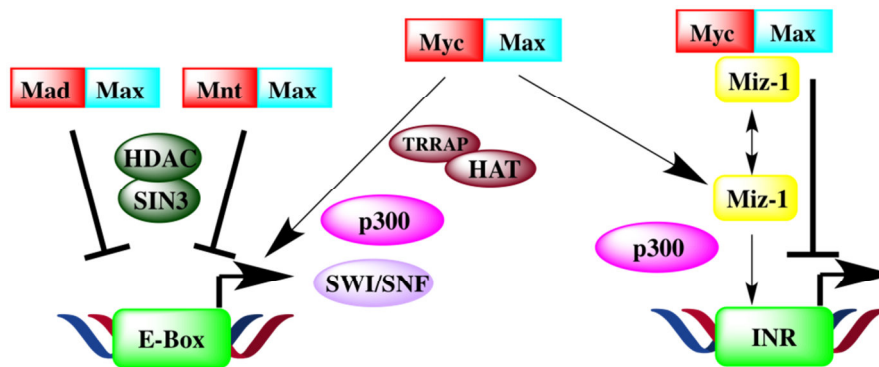


Abbildung 16: c-Myc als Regulator der Transkription und das c-Myc/Max/Mad-Netzwerk (nach Grandori *et al.* 2000, Baudino und Cleveland 2001, Patel *et al.* 2004, Meyer und Penn 2008)

TRRAP, p300: Histon-Acetyltransferasen
 SWI/SNF: Chromatinremodellierungskomplex
 HDAC: Histon-Deacetylase
 SIN3: Korepressor
 Miz-1: Transkriptionsfaktor
 E-Box: Konsensussequenz im Promotor
 INR: Initiatorelemente im Promotor

Nach Bindung des c-Myc-Max-Dimers an die E-Box Konsensussequenz erfolgt die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasekomplexen durch die N-Terminale Transaktivierungsdomäne des c-Myc-Proteins. Bestandteile dieser Komplexe sind unter anderem TRRAP (*transformation/transcription-domain-associated protein*), GCN5 (*general control of amino acid-synthesis protein-5*) oder TIP60 (*tat-interacting protein 60*). Des Weiteren können p300/CBP (*p300/CREB-binding protein*) Histoacetyltransferasen an c-Myc binden. Die HAT-Komplexe übertragen Acetylreste auf Histonseitenketten und dadurch können weitere Chromatin-modifizierende Proteine wie der ATP-abhängige Chromatinremodellierungskomplex SWI/SNF (*SWItch/Sucrose NonFermentable*) binden.

Insgesamt lockert sich dadurch die Bindung von Nucleosom und umwickelter DNA auf. Somit ergibt sich eine bessere Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II. Zusammen mit der gesteigerten Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II resultiert eine erhöhte Transkriptionsrate der entsprechenden Zielgene (Cheng *et al.*, 1999; Cole und Cowling, 2008; Li *et al.*, 2007; Lüscher und Vervoorts, 2012).

Das c-Myc-Max-Dimer kann nicht nur aktivierend sondern auch hemmend auf die Genexpression wirken. Ein Großteil der Gene, deren Transkription gehemmt wird, sind Miz-1 (*Myc interacting zinc finger protein 1*)-abhängig. Normalerweise bindet Miz-1 als Transkriptionsfaktor an Initiatorelemente (INR) innerhalb des Promotors von Genen wie p15^{INK4b} und aktiviert deren Expression. Das c-Myc-Max-Dimer bindet hingegen an Miz-1 und verhindert dadurch die Miz-1-vermittelte Transkription der Gene (Staller *et al.*, 2001).

Eine Wechselwirkung von c-Myc mit Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie sowie mit SP-1 (*specificity protein 1*) konnte ebenfalls beobachtet werden. Durch Bindung von c-Myc an SMAD-SP-1 wird ein inaktiver SMAD-SP-1-Myc-Komplex gebildet. Daraufhin wird die SMAD-vermittelte Aktivierung von SP-1 und die damit verbundene Aktivierung der Transkription SP-1-abhängiger Gene verhindert. Im Vergleich zur Hemmung der Miz-1-vermittelten Transkription tritt die Wechselwirkung mit SMAD und SP-1 unabhängig von der Dimerisierung mit Max auf (Feng *et al.*, 2002).

Das Protein Max kann auch mit weiteren Proteinen der bHLH-Zip-Familie interagieren. Dazu zählen Vertreter der Mad-Familie (*Max dimerization protein*) wie Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4 sowie das verwandte Mnt (Rox). Max-Komplexe mit diesen Proteinen binden an die gleichen E-Box-Konsensussequenzen im Promotor wie c-Myc-Max-Dimere. Im Gegensatz zu c-Myc-Max-Dimeren bewirken die zusätzlichen Max-Dimerisierungspartner allerdings keine Aktivierung sondern eine Hemmung der Transkription. Diese beruht auf der Bindung von Korepressoren der Sin3-Familie, wodurch Histon-Deacetylasen rekrutiert werden (Baudino and Cleveland, 2001). Als Max Dimerisierungspartner konkurrieren sie mit c-Myc um die Max-Bindung. c-Myc und Mad haben demnach antagonistische Wirkungen. Aus diesen Beobachtungen resultierte das c-Myc/Max/Mad Netzwerk, welches besagt, dass die jeweiligen Komplexe untereinander im Gleichgewicht stehen. Ein Ungleichgewicht in diesem Netzwerk verursacht durch differentielle Expression der Max-Bindungspartner als Antwort auf proliferative oder antiproliferative Signale kann zur Aktivierung oder Repression von Genen, die eine entsprechende E-Box-Sequenz beinhalten, führen (Grandori *et al.*, 2000).

3. Methoden

3.1. Zucht der Tiere

Als Versuchsmodell für die Tierstudie dienten AhR-defiziente- ($AhR^{-/-}$) und AhR-Wildtyp- ($AhR^{+/+}$) Mäuse. Die für die Zucht benötigten transgenen $Ahr^{+/-}$ -Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Bei der Züchtung des Stammes wurde das Exon 2 im AhR-Gen durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt. Die originale AhR^{tm1Bra} -Mutation wurde zehnmal mit dem Stamm C57BL/6 gekreuzt. Eine Zusammenfassung der Konstrukt-Details sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Zucht wurde ursprünglich im Finish Public Health Institute (Kuopio, Finnland) etabliert und im Tierhaus an der TU Kaiserslautern weitergeführt. Die Zucht erfolgte in einem klimatisierten Raum mit einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Standardfutterpellets. Serologische und bakteriologische Screenings wurden regelmäßig von allen Tieren durchgeführt, um den Gesundheitszustand zu kontrollieren. Die Verpaarung erfolgte zwischen heterozygoten Mäusen ($AhR^{+/-}$). Eine Verpaarung von homozygoten AhR-defizienten-Mäusen war aufgrund der reduzierten Fruchtbarkeit dieses Genotyps nicht möglich (Fernandez-Salguero und Gonzalez, 1996; Mimura *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1996).

Tabelle 1: Konstrukt Details

Strain Name	B6.129-Ahr^{tm1Bra}
Stock Number	002831
Type	JAX [®] GEMM [®] Strain – Targeted Mutation Congenic
TJL Mating System	Heterozygote x Heterozygote
Generation	N12
ES Cell Line	R1 (129)
Donor Strain	129X1 x 129S1 via R1 (+ ^{Kit-SLJ}) ES cell line
Donating Investigator	Dr. Christopher Bradfield, McArdle Laboratory for Cancer Research
Backcross Generation	N12F10 (15-jan-2003)
Background Strain	C57BL/6

3.2 Genotypisierung der Mäuse

3.2.1 DNA-Isolierung

Um den Genotyp der neugeborenen Mäuse zu bestimmen, wurden diese zunächst mit CO₂ narkotisiert. Danach wurde durch die Tierpfleger ein kleines Stück Gewebe von Schwanz oder Ohr entnommen. Diese Gewebstücke wurden in einem sterilen Eppendorf-Tube (1,5 ml) bei -20 °C bis zur DNA-Isolierung gelagert. Aus den Gewebeproben wurde DNA mittels des E.Z.N.A.TM Tissue DNA Kit (OMEGA bio-tek) isoliert. In Abbildung 17 ist das Fließschema der DNA-Isolation dargestellt. Hierfür wurden die aufgetauten Gewebeproben mit 180 µl *Buffer TL* und 25 µL Proteinase K (50mg/ml ddH₂O) versetzt und über Nacht bei 56 °C im Thermomixer lysiert. Die Proben wurden bei 13 000g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und anschließend mit 200 µl *Buffer BL* und 200 µl Ethanol (100 %) versetzt und 2 min gevortext. Zur Äquilibration der HiBind® DNA Mini Säulen wurden diese mit 100 µl *Equilibration Buffer* versetzt und bei 13 000 g für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die Proben wurden nun auf die Säulen gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 10 000 g. Das erhaltene Eluat wurde verworfen. Nun wurde 500 µl *Buffer HB* auf die Säulen gegeben und für 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säulen zweimal mit 700 µl und 400 µl *DNA Wash Buffer* gewaschen und bei 10 000 g zunächst 1 min zentrifugiert. Zum Trocknen der Säulen wurde 3 min bei 10 000 g zentrifugiert.

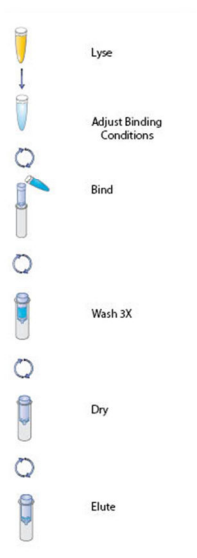


Abbildung 17: Fließschema des DNA-Isolationsprotokolls (Omega Bio-Tek, 2013)

Die DNA wurde mit vortemperiertem (70 °C) *Elution Buffer* eluiert. Hierfür wurde zweimal 150 µl *Elution Buffer* auf die Säulen gegeben und für 2 min bei RT belassen. Danach wurde

jeweils für 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt und deren Qualität spektrophotometrisch am Nanodrop ermittelt. Die isolierte DNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) der Maus-DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und erstmals 1987 veröffentlicht (Mullis und Faloona, 1987). Sie dient der schnellen, selektiven und exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA. Die PCR kann in 3 Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt, wird doppelsträngige DNA in einen Sense-Strang und einen Anti-sense-Strang aufgetrennt (Denaturierung). Dieser Schritt erfolgt bei 95 °C. Dabei werden Wasserstoffbrücken komplementärer Basen zerstört. Danach folgt im zweiten Schritt die Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA. Primer sind Oligonucleotide, die aus 15-30 Basen komplementär zur DNA-Sequenz der Ziel-DNA bestehen. Dieser Schritt erfolgt bei der für jeden Primer spezifischen Schmelztemperatur. Im letzten Schritt, der Elongation, bindet die Polymerase bei 72 °C an die Primer und fügt komplementär zum DNA-Template Desoxynukleotide (dNTPs) an das freie OH-Ende der Primer an. In jedem Elongations-Zyklus wird die Menge der DNA verdoppelt, dies führt zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Menge. Die isolierte DNA wurde mit folgendem Ansatz und Programm (siehe Tabelle 2 und 3) im Thermocycler (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany) vervielfältigt und danach bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: PCR-Ansatz für Maus Genotypisierung

	Volumen pro Reaktion [µl]	Firma
PCR Master Mix (2x)	12,5 µl	Fermentas (St. Leon-Rot, Germany)
Forward Primer Wildtyp 5'-GACACAGAGACCGGCTGAAC-3'	1 µl	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany)
Reverse Primer Wildtyp 5'-AGCATGTACCATCCAACAGC-3'	1 µl	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany)
Forward Primer AhR-Knockout 5'-TGAATGAACTGCAGGACGAG-3'	1 µl	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany)
Reverse Primer AhR-Knockout 5'-AATATCACGGGTAGCCAACG-3'	1 µl	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany)
DNA Probe	8,5 µl	
Gesamt-Volumen	25 µl	

Tabelle 3: PCR-Programm (MyCycler Protokoll) für Maus Genotypisierung

	Temperatur	Zeit
1 Zyklus	95 °C	4 min
40 Zyklen	95 °C	40 s
	53 °C	40 s
	72 °C	40 s
1 Zyklus	72 °C	10 min
Lagerung	4 °C	∞

3.2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um den Genotyp der Tiere zu ermitteln wurde die vervielfältigte DNA durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt.

Zunächst wurde ein 1,5 % Agarose/0,02 % Ethidiumbromid-Gel gegossen. Hierfür wurde die Agarose (0,75 g) mit 1 x TAE-Puffer (Tabelle 4) vermischt, in der Mikrowelle dreimal aufgeköcht und vorsichtig umgeschwenkt. Nach leichtem Abkühlen wurde 10 µl Ethidiumbromid (0,02 %) hinzugefügt und die Mischung in die Kammer gegossen. Die Luftblasen wurden entfernt. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt und das Gel zum Aushärten für 45 min beiseite gestellt. Das ausgehärtete Gel wurde dann mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Nach Entfernung des Kamms wurden die Geltaschen mit 15 µl Probe, die zuvor mit 5 µl 6x Ladepuffer (Tabelle 4) versetzt wurde, beladen. Zusätzlich wurde bei jedem Gel 8 µl eines DNA-Längenstandards (*MassRuler Low Spannweite DNA Ladder*) aufgetragen. Das Gel lief bei 90 V 90 min. Die negativgeladene DNA (abhängig vom pH-Wert des Puffers) wandert im Agarosegel zur Anode hin, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und die DNA-Ethidiumbromid-Fragmente können mittels UV-Licht am Eagle Eye II detektiert werden. Die Größe der DNA-Fragmente kann an Hand des DNA-Längenstandards abgelesen werden. Wurde nur ein DNA-Fragment bei 380 Basenpaaren (bp) detektiert, so handelte es sich um ein homozygotes AhR-Wildtyp-Tier (AhR^{+/+}). War nur ein Fragment bei 500 bp zu sehen, handelte es sich dabei um eine homozygote AhR-defiziente-Maus (AhR^{-/-}). Waren beide Fragmente bei 380 und 500 bp zu sehen, so handelte es sich um eine heterozygote AhR-Maus (AhR^{+/-}).

Tabelle 4: Für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese verwendete Puffer**50 x TAE-Puffer**

Tris	242,2 g (2M)
EDTA	14,6 g (50 nM)
Essigsäure	57,2 ml (1M)
Ad 1 l ddH ₂ O; pH = 8.3	

1 x TAE-Puffer

50 x TAE-Puffer	40 ml
Ad 2 l ddH ₂ O; pH = 8.3	

6 x Ladepuffer

50 % Glycerol
10% 50 x TAE-Puffer
40% ddH ₂ O
Spatelspitze Bromphenolblau

Tabelle 5: Zusammensetzung des 1,5% Agarose/0,02% Ethidiumbromid-Gels**1., % Agarose/0,02 % Ethidiumbromid-Gel**

Agarose	0,75 g
1 x TAE-Puffer	50 ml
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	10 µl

3.3 Behandlung der Tiere sowie Blut- und Organentnahme

Weibliche und männliche Mäuse jedes Genotyps ($AhR^{-/-}$ und $AhR^{+/+}$) im Alter von fünf bis acht Monaten wurden einmalig per Schlundsonde entweder mit Maiskeimöl als Vehikel oder TCDD in Maiskeimöl (25 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) behandelt. Das Applikationsvolumen betrug 25 $\mu\text{l}/10 \text{ g KG}$. Die Anzahl der Tiere pro Geschlecht, deren Genotyp und die Behandlung sind in Tabelle 6 aufgeführt. Während des Experiments wurden alle Tiere in separaten Makrolonkäfigen gehalten. Am 5. Tag der Behandlung wurden die Mäuse mit einer Überdosis Pentobarbital (3 $\mu\text{l}/\text{g KG}$ einer Pentobarbital-Lösung 33 $\text{mg}/\text{ml H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) i.p. anästhesiert. Nach Überprüfung der Schmerzfreiheit durch den Schwanz-Bauch-Reflex, wurde der Bauchraum geöffnet. Aus der *Vena Cava* wurde anschließend mit Hilfe einer heparinisierten Spritze (1 ml) Blut entnommen und zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C für kurze Zeit gelagert. Die Organe Leber, Niere, Lunge und Milz wurden entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei -80 °C im Biofreezer.

Tabelle 6: Anzahl der Tiere pro Geschlecht, deren Genotyp und die Behandlung

Genotyp /Behandlung	$AhR^{+/+}$ /Maiskeimöl	$AhR^{+/+}$ /TCDD	$AhR^{-/-}$ /Maiskeimöl	$AhR^{-/-}$ /TCDD
Tierzahl weiblich	4	4	4	4
Tierzahl männlich	3	3	2	2

Aufgrund der wenigen männlichen $AhR^{-/-}$ -Mäuse in der Zucht konnten zum Zeitpunkt der Behandlung nur jeweils zwei Mäuse pro Behandlungsgruppe im Versuch verwendet werden.

3.4 Metabolomics

Zum Feld der „omics“-Technologien zählen Metabolomics, Genomics, Transcriptomics, DNA-Adduktomics, Proteomics und weitere Methoden. Das primäre Ziel dieser Analyse-Technologien ist die ungerichtete Identifikation aller Genprodukte, darunter z. B. Proteine und Metaboliten einer biologischen Probe. Eine Analyse der Antwort eines Organismus auf eine Störung auf der Ebene des Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms, soll zu einem besseren Verständnis der biologischen und biochemischen Mechanismen in einem komplexen System führen (Dettmer *et al.*, 2007; Pohjanen *et al.*, 2007)

Die Bezeichnung Metabolom wurde in Analogie zu den Begriffen Genom und Proteom geprägt und bezeichnet die Gesamtheit aller Metaboliten in einer Zelle, einem Gewebe, Biofluid, Organ oder Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Dessen Analyse bezeichnet man als Metabolomics. Mit der Metabolomics Technik ist es möglich sämtliche intrazellulären und extrazellulären Metaboliten, die während des Metabolismus entstehen, mit

einem Molekulargewicht von unter 3000 Dalton (Da) zu detektieren, identifizieren und zu quantifizieren. Die Reproduzierbarkeit der Metabolomanalysen spielen eine besonders wichtige Rolle, da kleinste Veränderungen in der Umgebung z. B. durch Stress oder Belastung durch eine Substanz dazu führen, dass sich der Metabolismus ändert und somit auch kleinste Veränderungen im Metabolitenspiegel bewirken (Hollywood *et al.*, 2006; Rochfort, 2005).

Es gibt verschiedene Ansätze zur Analyse des Metaboloms. Das *metabolic profiling* fokussiert sich auf die quantitative Analyse einer Metaboliten-Gruppe, die zu einer Substanzklasse gehören oder zu einem spezifischen metabolischen Signalweg. Beim *metabolic fingerprinting* ist es nicht das Ziel jeden Metaboliten zu identifizieren, sondern Metabolitenmuster, den sogenannten Fingerprint, die sich in Folge von Krankheit, Umweltveränderungen, genetischen Veränderungen oder Belastungen durch Toxine verändern können, zu vergleichen (Dettmer *et al.*, 2007; Fiehn, 2002).

Die analytischen Methoden der Wahl für die Analyse des Metaboloms sind: NMR-Spektroskopie, GC-MS und HPLC-MS/MS. Allerdings macht es die Komplexität des Metaboloms unmöglich alle Metaboliten mit nur einer analytischen Methode zu erfassen. Darum ist es erstrebenswert mehrere analytische Methoden zu kombinieren (Issaq *et al.*, 2009).

3.4.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist eine moderne und sehr leistungsfähige chromatographische Technik zur Auftrennung und Analyse einer Probe wie Blutplasma oder Serum in ihre Bestandteile. Sie wird oft in der Chemie, Biologie und Pharmazie eingesetzt. Das Prinzip der HPLC beruht auf der Verwendung zweier unterschiedlicher Phasen, einer stationären und einer mobilen Phase. Die Auftrennung erfolgt durch ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption. Dabei müssen sich die Bestandteile der Probe in ihrem Adsorptions- bzw. Desorptionsvermögen unterscheiden. Die mobile Phase, welche die Probe trägt, fließt an der stationären Phase vorbei. In Folge von Interaktion mit der stationären Phase kommt es zu einer verzögerten Elution einiger Bestandteile, aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. Die unterschiedliche Bindungsstärke der verschiedenen Bestandteile der Probe und die anschließende Desorption führen zur Auftrennung der Probe. Dies geschieht in Abhängigkeit zum Oberflächenmaterial der stationären Phase (Gottwald, 1992).

Der prinzipielle Aufbau einer HPLC-Anlage ist in Abbildung 18 dargestellt. Die mobile Phase wird nach der Entgasung über Kapillaren durch eine oder mehrere Pumpen in die HPLC eingeleitet. Eine Lösung der Probe in einem mit der mobilen Phase mischbaren Lösungsmittel wird mit Hilfe eines Ventils in die Kapillare injiziert. Die Probe wird durch die mobile Phase über die Vorsäule auf die chromatographische Säule transportiert. Dort findet der

Trennvorgang statt. Bei Bedarf kann die Trennsäule durch einen Säulenofen temperiert werden. Die getrennten Probenbestandteile werden anschließend mittels eines geeigneten Detektors nachgewiesen (Cammann, 2001).

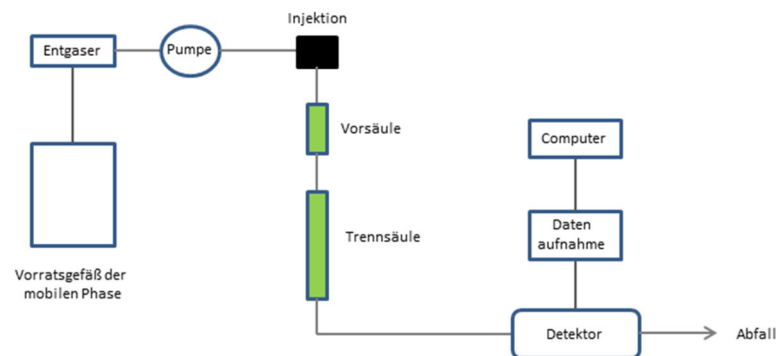


Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (Cammann, 2001)

Zur Anwendung kommen unterschiedliche Detektoren wie z.B. Lichtstreuendetektoren (*evaporative light scattering detectors*, ESLD), Brechungsindexdetektoren (RID), UV-Vis Detektoren, Chemolumineszendetektoren und Elektrochemische Detektoren (Cammann, 2001).

3.4.2 UV/Vis- Spektroskopie

Die UV/Vis- (*ultraviolet/visual*) Spektroskopie ist eine physikalische Methode zur Messung der Lichtabsorption eines Analyten im ultravioletten und sichtbaren Licht. Sie beruht auf der Anregung der Valenzelektronen durch Licht im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich. UV/Vis-Detektoren sind die am häufigsten verwendeten Detektoren in der HPLC. Sie sind relativ unempfindlich gegen Fluß- und Temperaturschwankungen, des Weiteren besitzen sie eine hohe, allerdings auch spezifische Empfindlichkeit. Sie können prinzipiell alle Verbindungen detektieren, die im UV-/Vis-Bereich Licht absorbieren, da die meisten Verbindungen mindestens eine chromophore Gruppe wie z. B. eine Carbonylgruppe oder einen aromatischen Ring besitzen. Verbindungen, die nicht im UV-/Vis-Bereich absorbieren, können derivatisiert (z. B. mit aromatischen Derivatisierungsreagenzien) und dadurch detektierbar werden (Cammann, 2001; Meyer, 2002; Skoog and Leary, 1996).

Die für die UV/Vis-Spektroskopie geeigneten Detektoren können in drei Gruppen unterteilt werden. Die technisch einfachsten Detektoren sind die Festwellenlängendetektoren, die in der Regel mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe ausgestattet sind. Diese Detektoren können nur eine feste Wellenlänge detektieren. Dabei handelt es sich meist um die Wellenlänge 254 nm. Die zweite Gruppe von UV/Vis-Detektoren enthält eine Lichtquelle, die ein

kontinuierliches Spektrum im ultravioletten (190-370 nm, Deuteriumlampe) oder sichtbaren (370-800 nm, Wolfram-Halogenlampe) Bereich ausstrahlen. Da die Wellenlänge bei diesen Detektoren variabel eingestellt werden kann, ist dies von Vorteil, da der Detektor exakt auf die Wellenlänge eingestellt werden kann, bei der das Absorptionsmaximum des Analyten liegt. Zur letzten Gruppe zählen die Diodenarray Detektoren. Diese bestehen aus Photodioden (512 bis 1024 Dioden) und können gleichzeitig mehrere Wellenlängen detektieren. (Cammann, 2001; Meyer, 2002).

3.4.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine vielseitig einsetzbare analytische Methode, bei der man Informationen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung sowohl organischer wie auch anorganischer Analyten in komplexen Mischungen sowie über die Struktur einer Vielzahl komplexer molekularer Spezies erhält (Skoog und Leary, 1996).

Das grundlegende, physikalische Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Bildung von Ionen organischer oder anorganischer Verbindungen, der Auftrennung dieser Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und der qualitativen bzw. quantitativen Detektion (Gross, 2004).

Das Massenspektrometer besteht aus mehreren grundlegenden Gerätebauteilen: dem Einlasssystem, der Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor (Cammann, 2001).

Die Analyse der in das Vakuum eines Massenspektrometers eingebrachten Probe erfolgt in der Regel unter Molekül-Fragmentierung beziehungsweise Atomisierung und Ionisierung der Probe, welche anschließend in das Vakuum des Massenspektrometers eingeleitet wird. Die Fragmentierung chemischer Verbindungen ist abhängig vom gewählten Ionisierungsverfahren. Zunächst müssen die eingebrachten Substanzen in freie positiv oder negativ geladene Ionen bzw. Radikale überführt werden, damit sie mittels einer entsprechend angelegten elektrischen Hochspannung für die Massenauftrennung beschleunigt werden können. Die Geschwindigkeit, die die Ionen erreichen können, ergibt sich aus der kinetischen Energie, die sie erhalten, in dem sie ionisiert und im Anschluss im elektrischen Feld beschleunigt werden. Für die Nachweisempfindlichkeit eines Massenspektrometers ist die Ionisationsausbeute ausschlaggebend. Organische Verbindungen lassen sich in der Regel im Bereich von 10^{-12} bis 10^{-17} mol noch quantitativ erfassen (Cammann, 2001; Skoog und Leary, 1996).

3.4.4 HPLC-MS/MS

Die direkte Kopplung eines HPLC-System und eines Massenspektrometers eignet sich für die qualitative und quantitative Bestimmung von polaren, schwer flüchtigen oder auch thermisch

labilen Verbindungen. Diese Methode konnte jedoch erst seit Entwicklung verschiedener Kopplungssysteme (Interfaces) routinemäßig eingesetzt werden. Hierbei wird das HPLC-Eluat durch eine Kapillare in das Interface eingebracht. Das Elutionsmittel wird dort vollständig entfernt und die zu analysierende Substanz schonend ionisiert. Dabei werden die Analyten unter Hochvakuum (10^{-5} torr) aus der mobilen, flüssigen Phase in die Gasphase überführt, was hohe Anforderungen an die Interfaces stellt (Cammann, 2001).

3.4.5 Elektronensprayionisation (ESI)

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der Elektronensprayionisation (ESI) angewendet. Da diese Ionisierungsart sehr schonend ist, eignet sie sich besonders für bereits ionisch vorliegende Substanzen oder für Substanzen, die leicht protoniert oder deprotoniert werden können. Auch große und empfindliche Moleküle werden bei der ESI-Methode praktisch nicht fragmentiert. Außerdem werden die häufig für eine Molmassenbestimmung gewünschten Molekülionen und Quasimolekülionen wie zum Beispiel $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oder $[M-H]^-$ erzeugt (Cammann, 2001). In Abbildung 19 ist die Elektronensprayionisation schematisch dargestellt (AB Sciex 2008). Bei der Elektronensprayionisation findet die Ionisierung unter Atmosphärendruck statt. Bei der Ionisierung kommt es zur Desolvatisierung, das heißt die Ionen werden aus der Lösung in die Gasphase gebracht. Der Prozess der Desolvatisierung kann in vier Schritte unterteilt werden. Zunächst bilden sich kleine geladene Tröpfchen.

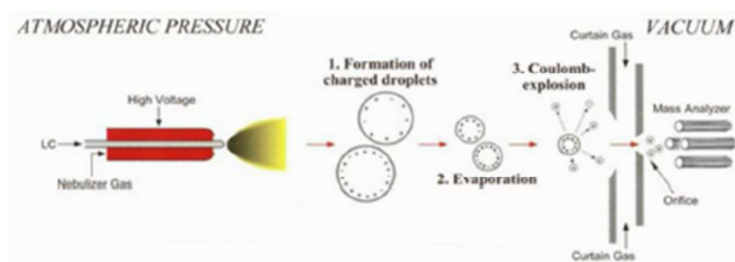


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation (AB Sciex, 2008)

Durch Verdampfen kommt es zum kontinuierlichen Verlust des Lösungsmittels. Dadurch verdichten sich die Ladungen an der Oberfläche der Tröpfchen. Übersteigt nun diese Oberflächenladung einen gewissen Punkt, das sogenannte *Rayleigh limit*, kommt es zur *Coulomb-Explosion*. Dabei zerfallen die Tröpfchen zu Mikrotröpfchen. Die ionisierten Teilchen treten bei Atmosphärendruck in die Gasphase über und werden über eine kleine Öffnung in der *Orifice-Plate* in das Massenspektrometer eingeleitet. Bei diesem Vorgang spielt Stickstoff eine wichtige Rolle, er dient zum einen der Desolvatisierung und zum

anderen kollidiert er mit den Molekülkomplexen, womit das Eintreten von vielen Neutralteilchen verhindert wird (Cammann, 2001; Gaskell, 1997)

3.4.6 Quadrupol-Tandemmassenspektrometer

Ein Quadrupol besteht aus vier parallel im Quadrat zueinander angeordneten Stabelektroden, die paarweise gegenüberliegend an eine jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle angeschlossen sind. Die Trennung der Ionen erfolgt durch Ablenkung mittels eines elektrischen Feldes. Das System wird zusätzlich mit einer modulierbaren Hochspannungsfrequenz überlagert, sodass nur Ionen gleicher Masse (Massenfilter) auf stabilen Wellenbahnen die Stabelektroden passieren und den Massendetektor erreichen (Cammann, 2001). In Abbildung 20 ist schematisch ein Quadrupolmassenfilter dargestellt.

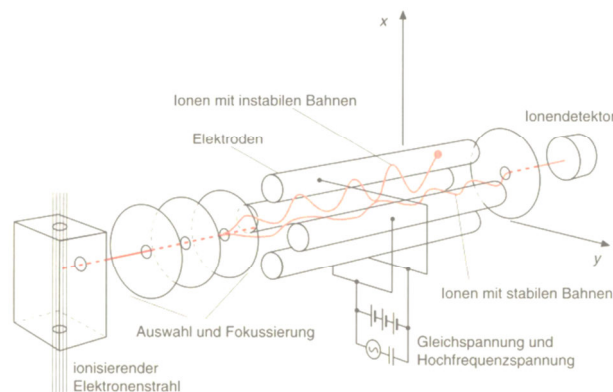


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines Quadrupolmassenfilters mit stabilen und instabilen Ionenbahnen (Cammann 2001)

Da für die Metabolomics-Analysen in der vorliegenden Arbeit ein Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer verwendet wurde, wird die Funktionsweise eines Tandemmassenspektrometers an diesem erläutert. In einem Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer sind drei Quadrupole Q1 bis Q3 in Reihe geschaltet. Diese Konstruktion bietet zusätzlich eine Möglichkeit der Strukturaufklärung. Im ersten Quadrupol Q1 kommt es zum Scan der Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis. In Q2, als Quadrupol bezeichnet, obwohl es einer Kollisionskammer entspricht, findet die Fragmentierung der in Q1 ausgewählten Massen statt. Dies geschieht durch Einleiten von Gas (N_2) und das Anlegen einer Spannung. Die Molekulargewichte der entstandenen Fragmentionen (Tochterionen) werden anschließend im Quadrupol Q3, entweder gescannt oder einzelne Massen selektiert, die dann zum Detektor gelangen. In Abbildung 21 ist ein Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer schematisch dargestellt (Cammann, 2001; Matissek *et al.*, 2009).

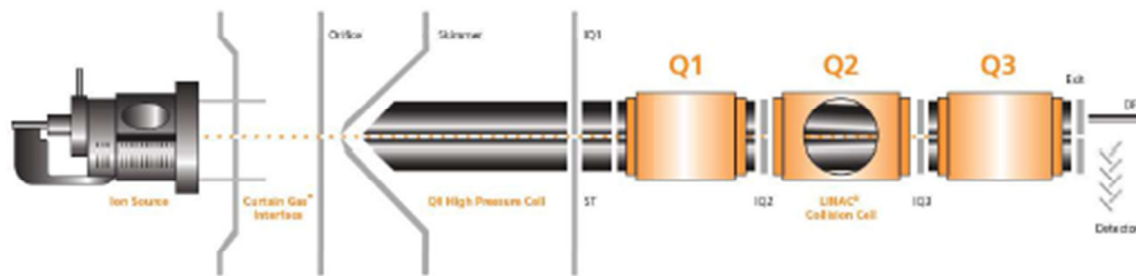


Abbildung 21: Schematische Darstellung eines Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometers (AB Sciex, 2010)

Die Methode der Wahl zur Identifizierung von Einzelkomponenten in einem Gemisch und/oder Strukturaufklärung von beispielsweise synthetisierten Standardsubstanzen ist der Produktionenscan (Abbildung 22). Hierbei wird Q1 so eingestellt, dass nur die Ionen mit dem zu analysierenden m/z -Verhältnis selektiv in Q2 transferiert werden. Die Vorläuferionen werden in der Kollisionskammer fragmentiert und die dabei gebildeten Produktionen in einem vordefinierten m/z -Bereich in Q3 detektiert (Cammann, 2001; Matissek *et al.*, 2009).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zur Identifizierung von Metaboliten wurden im Produktionenscan durchgeführt. Sämtliche Metabolomics-Messungen erfolgten im *full-scan*-Modus (Q3) durchgeführt. Dabei wurden sämtliche Massen von 50 - 500 m/z während des ganzen HPLC-Laufs detektiert.

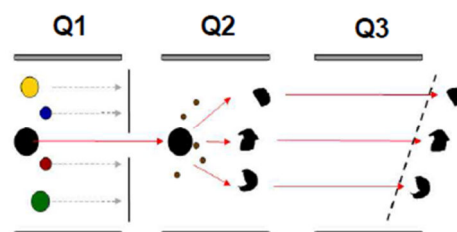


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Produktionenscans (AB Sciex, 2008)
In Q1 werden definierte Massen selektiert, die dann in der Stosskammer (Q2) fragmentiert werden und in Q3 in einem full scan untersucht werden.

3.4.7 Aufarbeitung der Vollblutproben und Messung

Das Vollblut wurde direkt nach der Entnahme mit 125 μM Anthranilsäure (10 mM in ddH₂O) als internem Standard (IS) versetzt. Anschließend wurde das Vollblut über eine Festphasenextraktionssäule (SPE) aufgereinigt und aufkonzentriert.

Die Konditionierung der SPE-Säulen (Machery-Nagel, Chromabond HR-X, 200 mg/3 ml) erfolgte durch Zugabe von 5 ml Methanol. Die Äquilibration wurde mit 5 ml ddH₂O durchgeführt. Zur Probenaufgabe wurde das Vollblut langsam auf die SPE-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 3 ml ddH₂O gewaschen und die Probe mit 5 ml Methanol/ddH₂O (85/15) in einen Rundkolben (10 ml) eluiert.

Tabelle 7: Optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Aufreinigung Vollblut mittels Chromabond HR-X (200 mg/3 ml)

Aufarbeitungsschritt	Bedingungen
Konditionierung	5 ml Methanol
Äquilibration	5 ml ddH ₂ O
Probenaufgabe	500 µl Vollblut
Waschen	3 ml ddH ₂ O
Trocknen	Unter leichtem Vakuum
Elution der Analyten	5 ml Methanol/ddH ₂ O (85:15)

Das Probeneluat wurde dann mittels Rotationsverdampfer und anschließend mit einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte bei -20 °C. Vor der Messung wurde die Probe mit 230 µl Methanol/ddH₂O (85/15) resuspendiert. Die Messungen wurden am Tripel-Quadrupol-Tandemmassenspektrometers API 2000 in Verbindung mit Elektronenspray-Ionisation (ESI) durchgeführt. Das Tuning und die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte mittels Polypropylenglykol (PPG)-Standards. In den Tabellen 8 und 9 sind die Parameter für den HPLC-Lauf sowie die Einstellungen des Massspektrometers (API2000, AB Sciex) aufgelistet.

Bei der Aufbereitung der Messungen wurde eine Volumenkorrektur (Abbildung 23) für jeden Metaboliten durchgeführt, da die Blutvolumina der Proben unterschiedlich waren.

$$\text{Integral (Metabolit}_{\text{corr}}) = \left(\frac{\text{Integral (Metabolit, in der jeweiligen Messung)}}{\text{Blutvolumen (der jeweiligen Messung)}} \right) * \text{Mittelwert (Blutvolumen)}$$

Abbildung 23: Formel der Volumenkorrektur

Die Aufbereitung der Full-Scan-Messungen sowie die Integration der Peaks wurde in Zusammenarbeit mit dem HelmholtzZentrum München (Institut für Bioinformatik und Systembiologie, Arbeitskreis Dr. Gabi Kastenmüller, Dr. Werner Römisch-Margl) durchgeführt. Die Auswertung der Fragmentierungsmessungen und die Identifizierung der Metaboliten erfolgten mit der Software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems) und den Datenbanken *Human Metabolome Database* (HMDB, Version 2.5), *Mouse Multiple tissue*

Metabolome DataBase (MMMDB) und *Massbank (High Quality Mass Spectral Database)*. Soweit eine Reinsubstanz vorhanden war, wurden die Fragmentmuster mit denen der Reinsubstanzen verglichen.

Tabelle 8: Parameter der HPLC-Läufe (HPLC Perkin Elmer)

Säule	LiChroCart – LiChrosphere, Merck	
Material	RP18, 250 mm x 4 mm x 5 µm	
Flussrate	0,75 ml/min	
Mobile Phase	A: H ₂ O _{ad} /Methanol (85:15) (0,1 % HCOOH)	B: Methanol
Injektionsvolumen	50 µl	
UV-Detektion	260 nm (Messwellenlänge)	
Gradient		
Zeit [min]	Mobile Phase A	Mobile Phase B
0,1	100	0
41	10	90
44	10	90
50	100	0
55	100	0

Tabelle 9: Einstellungen des Masspektrometers (API2000, AB Sciex)

DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CE: *collision energy*; CEP: *cell entrance potential*; CXP: *cell exit potential*; CUR: *curtain gas*; CAD: *collisionally activated dissociation*; IS: *ionspray voltage*; TEM: *temperature*; GS1: *Gas 1*; GS2: *Gas 2*

Parameter des Quadrupol	Werte
DP (V)	20
EP (V)	200
CE (eV)	15-25
CEP (V)	9,69
CXP (V)	15
Quelle/Gas	Werte
CUR (psi)	20
CAD	5
IS (V)	4200
TEM (° C)	400
GS1	20
GS2	20

3.5 Aufarbeitung der Gewebeproben

3.5.1 Mikrosomenpräparation

Mit Hilfe eines Skalpell wurden ca. 30 mg Gewebe von den bei -80 °C gelagerten Gewebeproben (Leber, Niere, Lunge und Milz) entnommen. Das Gewebe wurde mit 2,5 ml eiskaltem 1 x *IEB* (Tabelle 11) auf Eis homogenisiert, bis keine Gewebestückchen mehr zu erkennen waren. Das Homogenat wurde in zwei 2 ml Eppendorf-Tubes überführt, der Potter mit 0,5 ml 1 x *IEB* abgespült und mit dem Homogenat vereinigt. Die Proben wurden bei 4 °C, 1 000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in zwei neues 2 ml Tubes überführt und bei 4 °C, 12 000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in Ultrazentrifugen-Tubes überführt und bei 4 °C für 60 min bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet wurde in 75 µl Na/Pi-Puffer (Tabelle 12) aufgenommen und mittels Ultraschallsonde für 5 s homogenisiert. Gleiche Proben wurden vereinigt und der Proteingehalt mittels BCA-Assay bestimmt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des 5 x isotonic extraction buffer (IEB)**5 x isotonic extraction buffer (IEB)**

50 mM HEPES (pH 7,8)	1,2 g
1,25 M Saccharose	42,8 g
5 mM EGTA	0,19 g
125 mM KCl	0,93 g
ad 100 ml ddH ₂ O sterilfiltriert	
Lagerung: 4 °C pH = 7,8	

Tabelle 11: Zusammensetzung 1 x IEB**1 x IEB (in der Sterilbank ansetzen)**

5x IEB mit ddH₂O auf 1:5 verdünnen
 Kurz vor Verwendung 0,1 % Proteaseinhibitor-
 Cocktail zugeben

Tabelle 12: Zusammensetzung des NaPi-Puffers**50 mM NaPi-Puffer**

Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	7,52 g
NaH ₂ PO ₄	1,07 g
ad 1 000 ml ddH ₂ O	
Lagerung: 4 °C, pH = 7,6	

3.5.2 Herstellung des Zellysats für Western Blot-Analysen

Für Western Blot-Analysen wurden Proteine aus dem Lebergewebe von AhR-defizienten- und AhR-Wildtyp-Mäusen isoliert. Hierfür wurden 50 mg der bei -80 °C gelagerten Leber zunächst in 2 ml Lysispuffer (Tabelle 13) auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde die Leberprobe in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 15 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Ermittlung des Proteingehaltes im Überstand mittels BCA-Assay wurden die Proben auf einen Proteingehalt von 100 µg/15 µl eingestellt. Hierfür wurden die Proben mit ddH₂O verdünnt, mit 3 µl 6 x Lämmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurde bei 4 °C und 20 000 g für 10 min zentrifugiert. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Lysispuffers für die Western Blot-Analyse

Lysispuffer		
	Tris/HCl	606 mg (50 mM)
	EDTA	558 mg (15 mM)
	NaCl	876 mg (150 mM)
	Triton X-100	100 µl
Kurz vor Gebrauch	PMSF	17,4 mg (1 mM)
	Na ₃ VO ₄	18,4 mg (0,1 mM)
	Protease Inhibitor Cocktail	500 µl (0,5%)
	ddH ₂ O	ad 100 ml
	pH 8,0 Lagerung bei 4 °C	

3.5.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Beim Bicinchoninsäure (BCA) Assay handelt es sich um eine schnelle und sensitive Methode zur quantitativen Proteinbestimmung im Bereich von 0,5 µg/ml bis 2,0 mg/ml (Brown *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1985).

BCA ist eine heterozyklische Verbindung, die aus zwei verknüpften Chinolinmolekülen besteht, die jeweils in Position vier eine Carboxylgruppe aufweisen (siehe Abbildung 24).

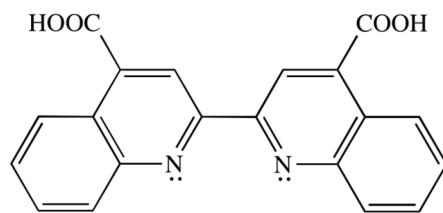


Abbildung 24: Strukturformel von Bicinchoninsäure (BCA)

Die Quantifizierung des Proteingehalts basiert auf der sogenannten Biuret-Reaktion. Unter alkalischen Bedingungen erfolgt durch Komplexbildung mit den Peptidbindungen der Proteine die Reduzierung von Cu^{2+} zu Cu^+ . Anschließend entsteht zwischen Cu^+ und der Bicinchoninsäure ein Chelatkomplex. Aufgrund der Interaktion zweier Bicinchoninsäuremoleküle mit einem Cu^+ -Kation bildet sich das violette Reaktionsprodukt, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 565 nm detektiert werden kann (Brown *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1985).

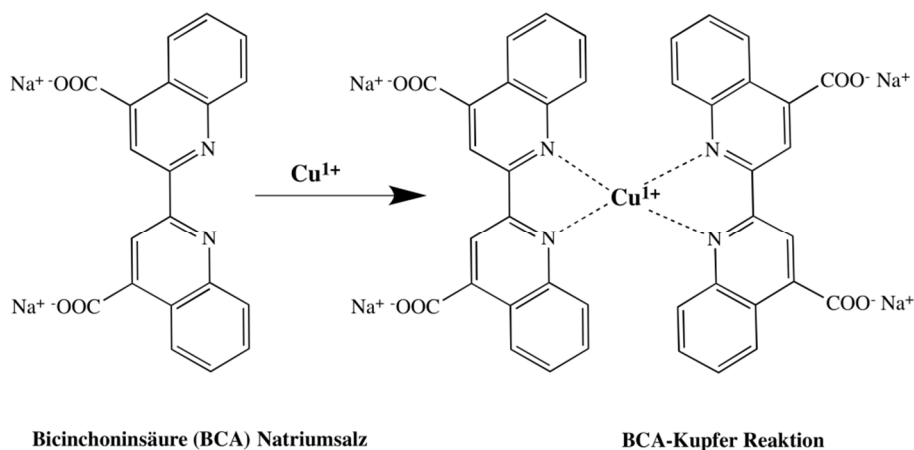


Abbildung 25: Chelatkomplexbildung eines Cu^+ und zwei Molekülen Bicinchoninsäure (nach Pierce, 2010)

Für eine Kalibriergerade wurde zunächst mit BSA (*bovine serum albumine*) in Natriumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,4) ein Referenzstandard angesetzt. Somit konnten die Proteingehalte der Proben auf die Konzentrationen von BSA bezogen werden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Pipettierschema der BSA-Eichgeraden

Standard	Volumen des Verdünnungsmittels (NaPi-Puffer) [μl]	Volumen der BSA-Lösung [μl]	Finale BSA Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 von Standard B	750
E	325	325 von Standard C	500
F	325	325 von Standard E	250
G	325	325 von Standard F	125
H	400	100 von Standard G	25
I	400	0	0 (Blank)

Es wurde je ein Triplikat durchgeführt, sowohl von der Kalibriergeraden, als auch von den Proben, die im Verhältnis 1:2 verdünnt eingesetzt wurden. Je 25 μl wurden in ein Well einer 96er Wellplatte pipettiert. Anschließend wurden in jedes verwendete Well 200 μl der Arbeitslösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min. Die Absorption wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 565 nm im Plattenreader gemessen.

3.5.4 mRNA-Isolierung aus Gewebe

Zur mRNA-Isolierung wurde das *RNeasy[®] Mini Kit* (Qiagen) eingesetzt. Hierfür wurden jeweils 30 mg der bei -80 °C im Biofreezer aufbewahrten Gewebeproben (Leber, Niere, Lunge, Milz) in Flüssigstickstoff schockgefroren, in einem Mörser zerkleinert und in ein Eppendorf Tube, in dem 600 μl RLT-Lysepuffer mit β -Mercaptoethanol (10 $\mu\text{l/ml}$ RLT) vorgelegt waren, überführt. Die Proben wurden anschließend durch zweiminütiges vortexen lysiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 20 000 g wurde der Überstand abgetrennt und in ein neues Tube überführt. Nach Zugabe von 600 μl Ethanol (70%) wurde die Probe durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren durchmischt. Vom Überstand wurden zunächst 700 μl , dann der Rest des Überstandes auf die *RNeasy Mini Spin Column* gegeben und jeweils 15 s bei 8 000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Durch mehrere Waschschriffe wurde die an das Säulenfüllmaterial gebundene RNA gereinigt. Im ersten Schritt wurden 700 μl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und anschließend 15 s bei 8 000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Im zweiten Schritt wurden 500 μl RPE-Puffer auf die Säule pipetiert und 15 s bei 8 000 g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde nach Zugabe von 500 μl RPE-Puffer 2 min bei 8 000 g und anschließend 1 min bei 20 000 g zentrifugiert, um die Säule zu trocknen und Rückstände von Ethanol in der RNA zu vermeiden. Die Elution der RNA aus der Säule erfolgte durch Zugabe von 30 μl RNase-freiem Wasser mittels einminütiger Zentrifugation

bei 8 000 g. Die Gehalte und die Qualität der RNA wurden am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt.

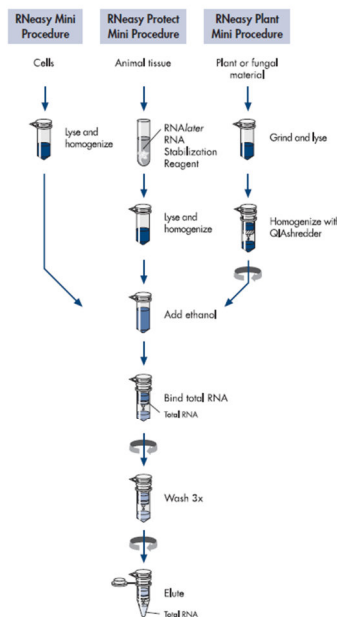


Abbildung 26: Fließschema der RNA-Isolationsmethode mit dem RNeasy Kit (Qiagen, 2010)

3.5.5 Bestimmung der Konzentration und Qualität der RNA

3.5.5.1 Spektrophotometer

Die Bestimmung der Konzentration und der Qualität der RNA erfolgt am NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer. Hierfür wurden jeweils 1,5 µl der Probe verwendet.

Die Methode basiert auf der Messung des Absorptionsmaximums von Nukleinsäuren bei 260 nm, wobei eine RNA-Lösung (40 µg/ml) einen Absorptionswert der optischen Dichte (OD) von 1 besitzt. Neben Nukleinsäuren wird auch die Absorption der Proteine bei deren Absorptionsmaxima 280 nm gemessen. Aus dem Absorptionsverhältnis 260/280 kann die Reinheit einer Probe abgeschätzt werden. Reine RNA-Lösungen haben ein Absorptionsverhältnis von 1,9-2,1. Ist dieses Verhältnis kleiner als 1,8, so ist die RNA durch Proteine, Phenol oder andere Kontaminanten, die bei 280 nm absorbieren, verunreinigt. Ein zweites Absorptionsverhältnis (OD_{260 nm}/OD_{230 nm}) dient ebenfalls der Untersuchung der Reinheit der RNA. Der Wert dieses Verhältnisses sollte zwischen 1,8-2,2 liegen (Berg *et al.*, 2003).

3.5.5.2 Bioanalyser

Die Qualität und Konzentration der RNA für den Microarray wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser und dem RNA 6000 PICO LabChip Kit geprüft. In Abbildung 27 ist die Versuchsdurchführung zur Messung der RNA-Konzentration und Reinheit zusammengefasst dargestellt.

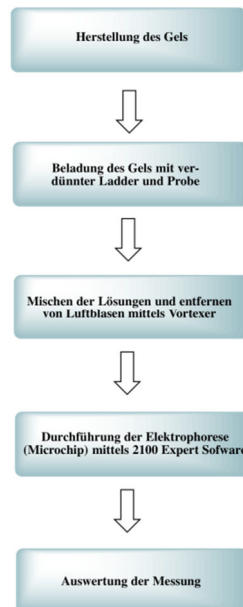


Abbildung 27: Zusammengefasste Versuchsdurchführung für die Überprüfung der RNA-Qualität und -Konzentration mittels Bioanalyser

Im ersten Schritt wurde die von den Nieren der Maus isolierte RNA mittels Gelelektrophorese auf einem Mikrochip aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Laser induzierter Fluoreszenz-Detektion der RNA-Gehalt und die Reinheit bestimmt. Die Software des Bioanalyzers generiert das Elektropherogramm und das Gelfoto sowie das Verhältnis ribosomaler Untereinheiten (18S/28S; rRNA) und die RNA Integrity Number (RIN) (Abbildung 28). Die Klassifizierung der RIN basiert auf einem Zahlensystem von 1 bis 10, wobei RNA mit einer RIN von 1 als degradierte RNA gilt und RNA mit einer RIN von 10 als intakte RNA anzusehen ist (Agilent Technologies 2004). Die Bioanalyser Analyse wurde mit einem Agilent RNA 6000 Pico LabChip Kit entsprechend des RNA 6000 Pico Kit Protokolls durchgeführt.

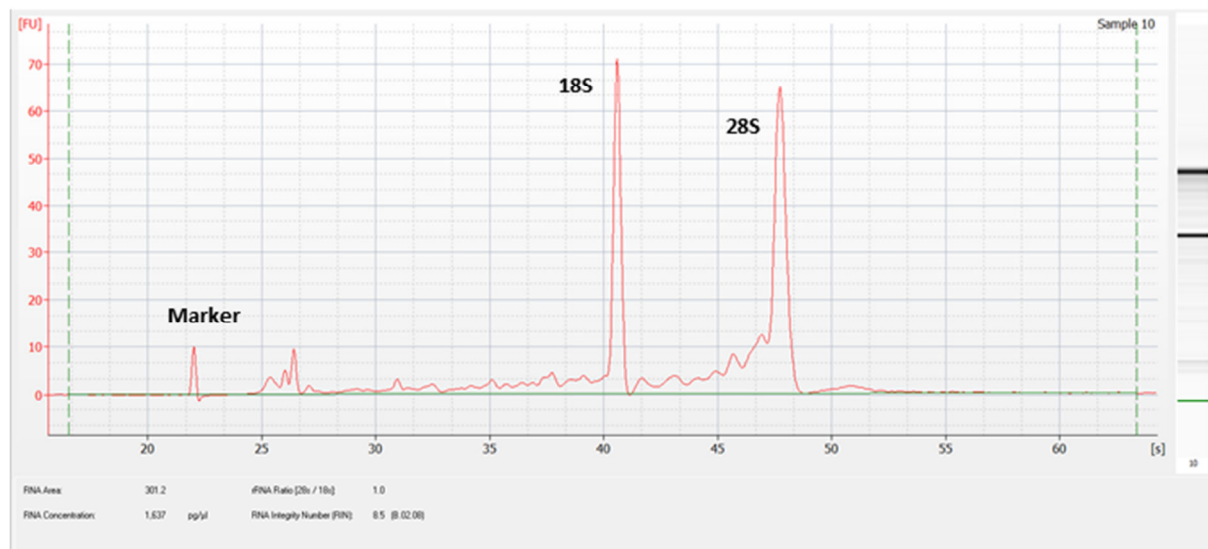


Abbildung 28: Beispiel für ein Elektropherogramm und das Gelfoto; RNA von der Niere einer behandelten AhR-defizienten Maus; RIN: 8,5; RNA-Konzentration: 1,637 pg/μl; rRNA-Verhältnis (28s/18s): 1.0

3.6 Biomolekulare Arbeiten

3.6.1 Microarray

Microarrays entstanden Mitte der 90 Jahre des letzten Jahrhunderts, indem Hybridisierungs- und anderweitige Interaktionsformate wie z. B. Macroarrays auf Nylonmembran für das Mikroformat adaptiert wurden. Mikroformat bedeutet im Allgemeinen Anpassung auf Glasträgerformate, wobei Microarrays nicht auf diese Form von Trägern beschränkt sind. Es ist zu erwarten, dass in Zukunft noch eine Reihe kleinerer Formate etabliert werden. Die Anwendungsmöglichkeiten sind nahezu unbeschränkt und lassen Experimente auf unterschiedlichsten Ebenen zu, solange diese sich mit der Interaktion von Molekülen befassen. Dies gilt insbesondere dann, wenn sehr viele Proben betrachtet werden sollen (Müller und Röder, 2004).

Derzeit gibt es schon viele unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten, in denen Microarrays zum Einsatz kommen. Einteilen lassen sich diese Microarray-Anwendungen entweder nach der vorhandenen Probe (DNA, Protein, PNA, Gewebe, andere Substanzen) oder nach der Art der wissenschaftlichen Fragestellung (Müller und Röder, 2004).

In dieser Arbeit wurde ein Nucleinsäure-Microarray durchgeführt. Unter diesem Begriff versteht man im Allgemeinen Microarrays, auf denen DNA, in seltenen Fällen auch RNA aufgebracht bzw. gebunden wird. Die DNA dient als Ziel für Hybridisierungspartner und ermöglicht Aussagen über bestimmte Aspekte der Nucleinsäureprobe, mit der hybridisiert wird (Müller und Röder, 2004; Schena *et al.*, 1995).

3.6.1.1 Microarray Versuchsdurchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpressionsanalyse mittels *Agilent's Two-Color Microarray-based Gene Expression Analysis* durchgeführt. Dafür wurde das *Kit Whole Mouse Genome Oligo Microarray Kit 4 x 44K* von Agilent Technologies verwendet.

Das hier verwendete Microarray Experiment basiert auf einer zwei Farb-Markierungsreaktion mit den beiden Fluorophoren Cyanin 3 (Cy3) und Cyanin 5 (Cy5), die eine unterschiedliche Emissionswellenlänge von 570 nm (grün) bzw. 670 nm (rot) aufweisen (Ernst *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 2007).

Die Proben unbehandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse wurden in diesem Experiment mit dem Fluorophore Cyanin 3 markiert und die Proben der mit TCDD-behandelten AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäuse wurden mit dem Fluorophore Cyanin 5 markiert. Es wurde mit drei Tieren pro Genotyp und Behandlungsgruppe gearbeitet und dabei die unbehandelten mit den behandelten Mäusen eines Genotyps verglichen. In Abbildung 29 sind die einzelnen Schritte des Experiments zusammengefasst abgebildet.

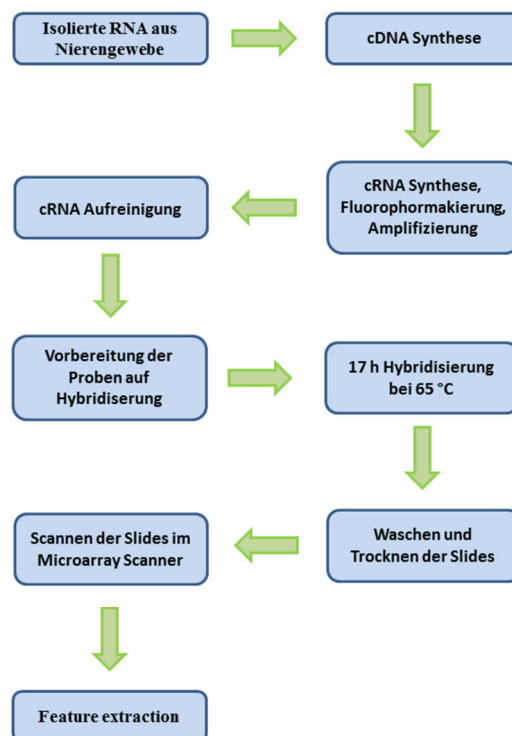


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Microarray Versuchsdurchführung

Zuerst wurde die von den Nieren isolierte RNA (100 ng pro Probe) in cDNA umgeschrieben, anschließend wurde aus der cDNA cRNA synthetisiert, diese mit den Fluorophoren markiert und amplifiziert. Die cRNA-Synthese wurde mit Hilfe des *Agilent's Low Input Quick Amp*

Labeling Kits (Agilent Technologies) durchgeführt. Anschließend wurde die cRNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und für die Hybridisierung vorbereitet. Die Hybridisierung wurde mit einem *Gene Expression Hybridization Kit* von Agilent Technologies in einem Hybridisierungssofen bei 65 °C für 17 h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Microarray Slides gewaschen und getrocknet, wofür ein *Gene Expression Wash Buffer Kit* (Agilent Technologies) verwendet wurde. Im Agilent B Microarray Scanner wurden die getrockneten *Slides* anschließend gescannt und die Daten mittels der *Agilent Feature Extraction Software* (Version 9.5.1) extrahiert.

Im folgenden Abschnitt soll genauer auf die einzelnen Schritte des Versuchs eingegangen werden.

1.Schritt: Vorbereitung der Spike-Ins

Die verwendeten Oligonucleotid Microarrays beinhalten eine Positivkontrolle, die mit den Spike-Ins hybridisiert. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um *in vitro* synthetisierte Polyadenylat-Transkripte vom Adenovirus E1A Transkriptom. Diese werden verwendet, um die korrekte Durchführung des Versuchs, von der Amplifikation der Proben bis hin zur Hybridisierung, zu kontrollieren. *Spike-In Mix A* ist mit dem Fluorophore Cyanin 3 markiert und *Spike-In Mix B* mit Cyanin 5 (Agilent Technologies 2010).

Beide *Spike-In* Lösungen wurden wie folgt hergestellt. Bei der ersten Verdünnung (1:20) wurde von den Stammlösungen (*Spike A Mix* und *Spike B Mix*) jeweils 2 µl in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert und mit 38 µl *Dilution Buffer* versetzt. Die ersten Verdünnungen der beiden *Spike-Ins* wurden kurz gevortext und zentrifugiert. Für die zweite Verdünnung, wurden jeweils 2 µl der ersten Verdünnung mit 75 µl *Dilution Buffer* vermischt und wie beschrieben gevortext und zentrifugiert. Die dritte Verdünnung wurde nach dem gleichen Verfahren mit 2 µl der zweiten Verdünnung und 62 µl *Dilution Buffer* hergestellt.

Tabelle 15: Verdünnung der *Spike-In Mix A* und *B* Lösungen

RNA Gehalt (ng)	Verdünnungen			<i>Spike-In Mix</i> Volumen (µl)
	1.Verdünnung	2.Verdünnung	3.Verdünnung	
100	1:20	1:40	1:32	2

2.Schritt: Vorbereitung der Markierungsreaktion

Die Proben wurden mit Nuklease-freiem Wasser so verdünnt, dass alle denselben RNA-Gehalt von 100 ng in 1,5 µl aufwiesen. Jeweils 1,5 µl der Proben wurden nun in Eppendorf-

Tubes mit 2 μl *Spike-In A Mix* (Cyanin 3-Markierung) oder *Spike-In B Mix* (Cyanin 5-Markierung) vermischt. Die Proben der unbehandelten AhR^{+/+} und AhR^{-/-} wurden mit Spike-In A Mix versetzt und die der behandelten AhR^{+/+} und AhR^{-/-} mit dem Spike-In B Mix. Anschließend wurde der *T7 Promotor Primer Mix* (Tabelle 16) verdünnt und 1,8 μl davon in jedes Tube pipettiert.

Tabelle 16: *T7 Promotor Primer Mix pro Reaktion*

<i>T7 Promotor Primer Mix</i>	
T7 Promotor Mix	0,8 μl
Nuklease-freies Wasser	1 μl
Gesamt-Volumen	1,8 μl pro Reaktion

Im Thermomixer erfolgte die Denaturierung der Versuchslösungen bei 65 °C für 10 min. Im Anschluss daran wurden die Proben auf Eis gestellt, für 5 min inkubiert und bei 4 °C und 10 000 g für 30 s zentrifugiert. Zu den so vorbereiteten Proben wurden 4,7 μl cDNA Master Mix (Tabelle 17) in jedes Tube pipettiert, durch mehrfaches auf- und ab-pipettieren vermischt und bei 40 °C für 2 h im Thermomixer inkubiert. Hierbei wird die RNA in cDNA umgeschrieben und mit der *T7 RNA Polymerase* Promotor Sequenz ausgestattet.

Tabelle 17: *cDNA Master Mix*

<i>cDNA Master Mix</i>	
First Strand Buffer (5x)	2 μl
DDT (0,1 M)	1 μl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 μl
AffinityScript RNase Block Mix	1,2 μl
Gesamt- Volumen	4,7 μl pro Reaktion

Um die *AffinityScript* Enzyme zu inaktivieren wurden die Proben unverzüglich bei 70 °C im Thermomixer 15 min inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min auf Eis belassen und für 30 s, mit 10 000 g bei 4 °C zentrifugiert.

Der *Transcription Master Mix* wurde, wie im Protokoll beschrieben, hergestellt (Tabelle 18). Zu jeder Probe wurden 6 µl davon hinzugefügt und durch mehrfaches auf- und ab-pipettieren vermischt. Nun wurden die Proben erneut bei 40 °C für 2 h im Thermomixer inkubiert.

Tabelle 18: *Transcription Master Mix*

<i>Transcription Master Mix</i>	
Nuklease-freies Wasser	0,75 µl
Transcription Buffer (5x)	3,2 µl
DTT (0,1 M)	0,6 µl
NTP Mix	1 µl
T7 Polymerase Blend	0,21 µl
Cyanin 3-CTP oder Cyanin 5-CTP	0,24 µl
Gesamt-Volumen	6 µl pro Reaktion

Mit der Hilfe von T7 RNA Polymerase wird die cDNA in cRNA umgeschrieben und amplifiziert. Die T7 Polymerase verwendet für die Amplifizierung die Cyanin 3- und Cyanin 5-markierten CTPs. Die so synthetisierte cRNA wurde für 5 min auf Eis belassen, zügig zentrifugiert und für den Aufreinigungsschritt vorbereitet. In Abbildung 30 ist die Synthese, Amplifizierung und Cyanin-Markierung der cRNA zusammengefasst dargestellt.

3.Schritt: Aufreinigung der Cyanin-markierten und amplifizierten cRNA

Die Aufreinigung wurde mit einem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden 84 µl Nuklease-freies Wasser und 350 µl des *RLT Buffers* zu jeder cRNA-Probe hinzugefügt. Die Probe wurden durch mehrfaches auf- und ab-pipettieren gemischt und danach mit jeweils 250 µl Ethanol (p.a.) in gleicher Weise vermischt. Der cRNA-Ethanol Mix (700 µl) wurde nun auf die RNeasy Mini Säulen überführt und für 30 s bei 4 °C und 13 000 g zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die cRNA an die Membran der Säulen. Das entstandene Eluat wurde verworfen. Die an die Membran gebundene cRNA wurde mit 500 µl *RPE Buffer* zweimal gewaschen und für 30 s, 13 000 g bei 4 °C zentrifugiert. Beim zweiten Waschschrift wurde für 1 min zentrifugiert, um sämtliche Spuren des *RPE Buffer* von der Säule zu entfernen. Die Säule wurde nun in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und

die cRNA mittels 30 µl Nuklease-freiem Wassers eluiert. Hierfür wurde, nach Zugabe des Nuklease-freiem Wassers auf die Säule, diese für 1 min bei RT belassen und anschließend bei 4 °C und 13 000 g für 30 s zentrifugiert. Die eluierte cRNA wurde dann bis zur weiteren Untersuchung (Quantifizierung des RNA-Gehaltes, deren Qualität und die Einbaurate der Cyanine) auf Eis gelagert.

4.Schritt: Quantifizierung des RNA-Gehaltes, deren Qualität und spezifische Aktivität der Cyanine

Zur Quantifizierung des RNA-Gehaltes, deren Qualität und der Einbaurate der Cyanine wurde der Nanodrop 1000 verwendet und in der Nanodrop Software die Methode „Microarray“ benutzt wurde. Es wurden folgenden Punkte gemessen:

- Cyanin 3 (Cy3) oder Cyanin 5 (Cy5) Farbstoff Konzentration (pmol/µl)
- RNA Absorbtion (260 nm/280 nm)
- cRNA Konzentration (ng/µl)

Der Gehalt der cRNA wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{Konzentration cRNA} \times 30 \mu\text{l Elutionsvolumen})}{1000} = \mu\text{g cRNA}$$

Die Einbaurate der Cyanin-Farbstoffe wurde wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Konzentration Cy3 oder Cy5}}{\text{Konzentration cRNA}} \times 1000 = \text{pmol Cy3 oder Cy5 pro } \mu\text{g cRNA}$$

Der Gehalt der cRNA sollte > 0,825 µg sein und die Einbaurate > 6 pmol Cy3 oder Cy5 pro µg cRNA.

5.Schritt: Vorbereitung der Hybridisierung

Die Hybridisierung der gereinigten und Fluorophor-markierten cRNA wurde mit einem *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies) durchgeführt.

Zuerst wurde der gefriergetrocknete 10 x *Blocking Agent* in 500 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst, kurz gevortext, für 5 min bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert.

Bei der Zubereitung des *Fragmentation Mix* (Tabelle 19) wurde die cRNA-Probe eines unbehandelten Tieres (Cy3 markiert) mit der eines behandelten (Cy5 markiert) vereinigt. Bei beiden Genotypen wurde gleich verfahren. Um die RNA zu fragmentieren wurden die so erhaltenen Proben im Thermomixer bei 60 °C für exakt 30 min inkubiert. Danach wurden die Proben sofort für 1 min auf Eis inkubiert und mit 55 µl des 2 x *GEx Hybridization Buffer HI-RPM* versetzt. Vorsichtig, unter Vermeidung von Blasenbildung, wurde der Mix durch auf- und ab-pipettieren vermischt. Anschließend wurde bei RT und 13 000 g für 1 min zentrifugiert. Die Proben wurden danach direkt auf die *Array-Slides* geladen. Hierfür wurde ein *Gasket Slide* in eine Halterung eingebracht, sodass das *Agilent Label* mit der Schriftseite nach oben lag. Da das *Gasket-Slide* aus vier Wells besteht können pro *Slide* vier Proben vermessen werden. Pro Well wurde nun vorsichtig jeweils eine Probe auf die Mitte des Wells aufgetragen und die Lage dokumentiert. Mit der Schriftseite (Barcode) nach oben wurde der *Microarray-Slide* unter Vermeidung von Blasenbildung auf den *Gasket-Slide* gelegt. Nachdem die Halterung fest verschlossen war wurde der Array nochmals auf Blasenbildung überprüft. Danach wurde die Halterung in einem auf 65 °C vorgeheizten Hybridisierungssofen befestigt und bei 10 rpm für 17 h belassen.

Tabelle 19: *Fragmentation Mix*

<i>Fragmentation Mix</i>	
Cyanin 3-makierte, auf gereinigte cRNA	825 µg
Cyanin 5-makierte, auf gereinigte cRNA	825 µg
Blocking Agent (10x)	11 µl
Fragmentation Buffer (25x)	2,2 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 52.8 µl
Gesamt Volumen	55 µl

6.Schritt: Waschen der Microarray-Slides

Nach 17 h Hybridisierung wurde die Halterung mit den *Slides* aus dem Hybridisierungssofen entnommen und die Halterung vorsichtig demontiert. Die *Slides* wurden zum Waschen in eine kleine Schüssel mit Wash Buffer 1 gelegt und die *Microarray-Slides* mit einer Pinzette vorsichtig von den *Gasket-Slides* getrennt. Die *Microarray-Slides* wurden nun in einer weiteren Schüssel mit *Wash Buffer 1* für 1 min bei RT gewaschen. Anschließend wurden sie in auf 37 °C vorgewärmten *Wash Buffer 2* für 1 min bei RT gewaschen. Die trockenen *Slides*

wurden dann mit der Schriftseite nach oben in die *Slide*-Halterung des Scanners eingebracht und diese direkt in das Scanner-Karussell gestellt.

7.Schritt: Scannen der Slides und Aufbereitung der Daten

Nach dem Waschen wurden die Microarray-*Slides* unverzüglich gescannt. Es wurde ein *Agilent Microarray B Scanner* (Scanner Model G250B) mit der Software Version A.7.0.1 verwendet. Nun folgte die *Feature Extraction* unter Verwendung der *Agilent Feature Extraction Software* (version 9.5.1). Die Normalisierung der Daten und die statistische Auswertung wurden mit der Software Bioconductor R (Version 2.15.1) package Limma (Version 3.12.2) durchgeführt (Gentleman *et al.*, 2004; Smyth, 2004). Zwei Normalisierungsmethoden wurden angewendet: die „Global Loess Methode“ und die „Aquantile Methode“. Als *Cut-Off*-Kriterien wurde ein $\log_2 \text{fold change} (fc) \geq 1$ oder ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$ korrigiert mit *false discovery rate* (FDR) nach der Benjamini-Hochberg-Methode (Benjamini und Hochberg, 1995) und einer Signalintensität $(A) \geq 7$ gewählt. Mit der Liste der nun erhaltenen Gene wurde eine *Gene Ontology*-Analyse mit der Software topGO (Version 2.8.0) package R (Alexa *et al.*, 2006) durchgeführt.

3.6.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der für die Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) benötigten cDNA wird durch reverse Transkription (RT) ermöglicht.

Bei der praktischen Durchführung wurde ein *iScript-Kit* verwendet und nach Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Zunächst wurde der RNA-Gehalt der Proben eingestellt. Die RNA wurde in PCR-Reaktionsgefäßen (200 µl) mit Nuklease-freiem H₂O auf einen RNA-Gehalt von 1 µg/15 µl verdünnt. Nach anschließender Zugabe von 4 µl 5 x *iScript Reaction Mix* sowie 1 µl *iScript Reverse Transcriptase* wurde das Temperaturprogramm aus Tabelle 20 im MyIQ-Cycler (BioRad) durchlaufen. Die erhaltene cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Tabelle 20: Temperaturprogramm cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Dauer
Primer Anlagerung	25 °C	5 min
Reverse Transkription	42°C	30 min
Enzym-Denaturierung	85°C	5 min
Programmende	4°C	10 min

3.6.3 Real-Time PCR (RT-PCR)

Die Polymaerasekettenreaktion (PCR polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR kann dabei in drei Reaktionsschritte unterteilt werden. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird doppelsträngige Template-DNA (cDNA) denaturiert, wobei der DNA-Doppelstrang auf getrennt wird. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer bei einer spezifischen Temperatur. Die Primer dienen als Startpunkt für die DNA-replizierenden Enzyme. Im letzten Schritt, der Elongation, werden bei konstanter Temperatur (72 °C) durch die Taq-Polymerase die Doppelstränge synthetisiert. Es muss dabei eine Temperatur gewählt werden, bei der das Enzym ein Aktivitätsmaximum besitzt damit eine schnelle Verlängerung gewährleistet wird. Die Taq-Polymerase vervollständigt einzelsträngige DNA mit einem komplementären Doppelstrang (Linz und Degenhardt, 1990). Durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C werden die neu gebildeten DNA-Stränge denaturiert und können erneut als Template fungieren. Der Zyklus Denaturierung, Annealing und Elongation wird 40-mal wiederholt. Die Amplifikat-Menge verdoppelt sich theoretisch nach jedem Zyklus. In Tabelle 21 ist das verwendete Temperturprogramm dargestellt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Real Time-PCR werden die Amplifikationsmengen der DNA mittels des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green* in Echtzeit verfolgt. Dabei wird nach jeder Wiederholung eines Zyklus die Fluoreszenz des in den Doppelstrang eingelagerten *SYBR-Greens* bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Durch die Verwendung von spezifischen Primern wird das gewünschte Produkt bevorzugt amplifiziert. Steigt dessen Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz spricht man vom Cp-Wert (Crossing Point). Dieser Wert wird dann zur weiteren Berechnung verwendet. Nach der eigentlichen PCR wird bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung die Schmelzkurve erstellt. Diese Kurve dient zur Überprüfung der Spezifität der Primer. Mit steigender Temperatur kommt es beim Schmelzpunkt des gewünschten PCR-Produktes zu einem abrupten Abfall der Fluoreszenz. Durch Ableitung der Kurve erhält man die Schmelztemperatur des Produktes. Wenn Nebenprodukte entstehen, würde die Fluoreszenz mehrmals abfallen und man erhielte mehrere Schmelztemperaturen (Engels und Lottspeich, 2006; Linz und Degenhardt, 1990).

Tabelle 21: Temperaturprogramm der RT-PCR

Zyklus	Wiederholung	Temperatur	Dauer	Beschreibung
Zyklus 1	1 x	95 °C	15 min	Aktivierung der Taq-Polymerase
Zyklus 2	40 x	95°C	20 s	Denaturierung
		52-63°C	30 s	Anlagerung der Primer, temperaturspezifisch
		72°C	30 s	Synthese der komplementären Stränge
Zyklus 3	1 x	95°C	1 min	Denaturierung
Zyklus 4	1 x	58°C	1 min	Beginn der Schmelzkurve
Zyklus 5	80 x	55°C	10 s	+ 0,5°C bei jeder Wiederholung

Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurde die durch Reverse Transkriptase hergestellte cDNA eingesetzt. Die RT-PCR wurde mit *iQ SYBR-Green Supermix* (BioRad) im iCycler (BioRad) im folgenden Reaktionsansatz (Tabelle 22) durchgeführt.

Tabelle 22: RT-PCR Reaktionsansatz

Reaktionsansatz für Umschreibung mRNA in cDNA

cDNA Template	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
<i>SYBR-Green</i>	12,5 µl
RNase freies H ₂ O	9,5 µl

Die für die RT-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 23 aufgelistet. Die Primer wurden mit Hilfe von *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), das online auf der Homepage von *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) verfügbar ist, erstellt. Bei der Validierung der Primer wurde darauf geachtet, dass sie nur das gewünschte Produkt spezifisch bilden. Außerdem wurde die Produktgröße auf 200 bp begrenzt, um die Dauer der Synthese nicht unnötig zu verlängern damit die zur Verfügung stehende Menge dNTPs ausreicht. Die Anlagerungstemperatur (T_a) der Primer wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt. Es wurden nur Primer verwendet, die eine Effizienz von 100 % aufwiesen.

Tabelle 23: Verwendete Primer für RT-PCR

Primer	Sequenz	Bp	Ta [°C]
Actin	for 5'- AGCCATGTACGTAGCCATCCA - 3'	21	58
	rev 5'- TCTCCGGAGTCCATCACAATG - 3'	21	
Afp	for 5'- GTTCCAGAACCTGCCGAGA - 3'	20	60
	rev 5'- ACTCCAGCGAGTTTCCTTGG - 3'	20	
Ahr	for 5'- TTCTTAGGCTCAGCGTCAGCTA - 3'	22	60
	rev 5'- GCAAATCCTGCCAGTCTCTGAT - 3'	22	
Asns	for 5'- ACCTATGGAGTCAGGCCCTT - 3'	20	58
	rev 5'- AGATCACCACGCTGTCTGTG - 3'	20	
Anxa1	for 5'- TTCTTAGGCTCAGCGTCAGCTA - 3'	20	57
	rev 5'- GCAAATCCTGCCAGTCTCTGAT - 3'	20	
Cdh1	for 5'- AACCCAAGCACGTATCAGGG - 3'	20	58
	rev 5'- ACTGCTGGTCAGGATCGTTG - 3'	20	
c-Myc	for 5'- GACTGACCCAACATCAGCGG - 3'	20	60
	rev 5'- ATCGTCGTGGCTGTCTGCG - 3'	19	
Cyp1a1	for 5'- ACTTCATTCCTGTCTCCGTTACC - 3'	24	52
	rev 5'- GCCCTTCTCAAATGTCTGTAGTG - 3'	24	
Cyp1a2	for 5'- CCGAGGAGAAGATTGTCAACATTG - 3'	24	52
	rev 5'- GCCAACCACCGTGTCCAG - 3'	18	
Cyp1b1	for 5'- ACCAGAAGTCCTCCTACCAAGAGA - 3'	24	63
	rev 5'- GCCTCATCCAGGGCTATAAAGG - 3'	22	
Cyp2b10	for 5'- AGTGTGGAGGAGCGGATTCAGG - 3'	22	60
	rev 5'- AACAGCTCCAGCAGGCGCAA - 3'	20	
Cyp3a44	for 5'- ACAGAGAGTCACACATACATCTGGAGG - 3'	27	58
	rev 5'- TGTGTACGGGTCCCATATCGGTAGAG - 3'	26	
Cyp24a1	for 5'- ACAGAGTACTCGGGCCAAAC - 3'	20	60
	rev 5'- GTCCTTTTGAAGGAGCCCGA - 3'	20	
Cyp27b1	for 5'- GGTGAAGAATGGCAGAGGCT - 3'	20	61
	rev 5'- TGATGCCCAGACGGCATATC - 3'	20	
E2f3	for 5'- CTTGGCGCGTAAACCGTATC - 3'	20	60
	rev 5'- CAGCCGGAGTTTCCAAGTCT - 3'	20	
Egf	for 5'- GTTAGCACCATCCCTCATCCC - 3'	21	60
	rev 5'- GGCCCCAGGGCATCTTTTAT - 3'	20	
Esm1	for 5'- TTACCCGGAGGACCTTAGCA - 3'	20	60
	rev 5'- GGTTGCGCTTACATTCACGG - 3'	20	
F10	for 5'- CCCAGCCAGAAGATTGAGGG - 3'	20	57
	rev 5'- CAGCTGGTAGAGGGGTCAGT - 3'	20	
Fgb	for 5'- ATGACCATCCACAACGGCAT - 3'	20	57
	rev 5'- GATCCGTAGTTACCCAGCCG - 3'	20	

Primer	Sequenz	Bp	Ta [°C]
Fgg	for 5'- GCACCACAGAGTTTTGGCTG - 3'	20	57
	rev 5'- GCCCAAATAATGCCGTCGTC - 3'	20	
Hba-a1	for 5'- TGCATGCCTCTCTGGACAAA - 3'	20	57
	rev 5'- AGAGGTACAGGTGCAAGGGA - 3'	20	
Hba-a2	for 5'- TCCCGTCAACTTCAAGCTCC - 3'	20	57
	rev 5'- GGCTTCTTCTACTCAGGCT - 3'	20	
Hbb-b1	for 5'- TGAATCACTTGGACAGCCTCAA - 3'	22	57
	rev 5'- AGCTAGATGCCCAAAGGTCT - 3'	20	
Hbb-b2	for 5'- GTGAACCCCGATGAAGTTGGT - 3'	21	57
	rev 5'- CCTTGAGGTTGTCCAGGTTT - 3'	20	
Igfbp1	for 5'- CTGTCCTTCCAGATTGGCGT - 3'	20	58
	rev 5'- GCTATAGGTGCTGATGGCGT - 3'	20	
IL-1 α	for 5'- AGGGAGTCAACTCATTGGCG - 3'	20	60
	rev 5'- ACTTCTGCCTGACGAGCTTC - 3'	20	
IL-1 β	for 5'- AGCTTCAGGCAGGCAGTATC - 3'	20	60
	rev 5'- AAGGTCCACGGGAAAGACAC - 3'	20	
IL-6	for 5'- ACAAGTCCGAGAGGAGACT - 3'	20	60
	rev 5'- GTCTTGGTCCTTAGCCACTCC - 3'	20	
IL-10	for 5'- TAAGGCTGGCCACACTTGAG - 3'	20	60
	rev 5'- GTTTTTCAGGGATGAAGCGGC - 3'	20	
Lpl	for 5'- CCAGCTGGGCCTAACTTTGA - 3'	20	58
	rev 5'- AACTCAGGCAGAGCCCTTTC - 3'	20	
Pla2g4a	for 5'- AACCCCGTGTGGAATGAGAC - 3'	20	58
	rev 5'- GAACCCAAAATGGCCACCAC - 3'	20	
Rps14	for 5'- TCTTTCCGGTGGAGGAGTCT - 3'	20	57
	rev 5'- CACTCGGCAGATGGTTTCCT - 3'	20	
Serpinc1	for 5'- GGACGACATCTGCATAGCGA - 3'	20	57
	rev 5'- CACCCAGCTTGGTCATAGCA - 3'	20	
Tdo2	for 5'- CAGAGCAGGAGCAGACGCTGTTG - 3'	23	60
	rev 5'- GGCTCTAAACCAGGTGTTCTTTCCAG - 3'	26	
TNF- α	for 5'- ACCGTCAGCCGATTTGCTAT - 3'	20	60
	rev 5'- CCGGACTCCGCAAAGTCTAA - 3'	20	
VDR	for 5'- CTCCGGAGACTCCTCCTCCA - 3'	20	60
	rev 5'- GGATAGGCGGTCCTGAATGG - 3'	20	

3.6.3.1 Auswertung der RT-PCR Daten

Die RT-PCR wurde nach der $\Delta\Delta C_p$ Methode ausgewertet. Dabei geht man davon aus, dass die Primer-Effizienz bei annähernd 100 % liegt. Bei solch einer Effizienz wird idealer Weise

das Amplifikat bei jedem Zyklus verdoppelt. In der Berechnung der x-fachen Induktion geht dies mit dem Wert 2 ein. Die x-fache Induktion eines Gens wird mit Hilfe der Cp-Werte des Referenzgens (in der vorliegenden Arbeit ist dies Actin) und des zu messenden Gens wie folgt berechnet:

$$\Delta C_p = C_p (\text{Gen}) - C_p (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta \Delta C_p = \Delta C_p (\text{Behandlung}) - \Delta C_p (\text{Kontrolle})$$

$$\text{x-fache Induktion} = 2^{-\Delta \Delta C_p}$$

3.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht auf der Wanderung von geladenen Molekülen (Ionen) in einem elektrischen Feld. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes „wandern“ die Proteine durch das Polyacrylamid-Gel und werden dabei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Zugabe des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die individuellen Ladungsunterschiede der Proteine überdeckt, Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, sowie hydrophobe Wechselwirkungen und die Sekundärstrukturen aufgehoben. Ein SDS-Molekül bindet jeweils an drei Aminosäuren, d. h. es entstehen anionische Micellen mit konstantem Masse/Ladungsverhältnis. Die Anzahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der nun negativ geladenen Proteine, die der Masse entsprechend aufgetrennt werden können. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol werden alle Disulfidbrücken gespalten, so dass die Proteine entwunden vorliegen. Das Gel besteht aus Polyacrylamid, das durch eine chemische Kopolymerisation eines Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisches entsteht. Als Katalysator dient *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und als Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Berg *et al.*, 2003; Engels und Lottspeich, 2006).

Eine verbesserte Auftrennung der Proteine erreicht man mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Hierfür werden zwei unterschiedliche Polyacrylamidgele senkrecht übereinander polymerisiert. Das großporige Sammelgel (pH 6,8) fokussiert die Probe zu einem dichten Proteinstapel. Im darunterliegenden engporigen Trenngel (pH 8,8) werden die Proteine aufgetrennt. Im Gel werden als Anionen ausschließlich schnelle Leitonen, wie z. B. Cl^- verwendet. Im Elektrodenpuffer werden dagegen nur langsame Folgeionen verwendet wie z.B. Glycin. Die Cl^- -Ionen wandern bei Gleichspannung dem Protein und dem Glycin im Sammelgel voraus. Das Glycin-Ion wird, bedingt durch den niedrigen pH-Wert des Sammelgels (pH 6,8), protoniert und fällt als Ladungsträger aus. Die sich langsam im Sammelgel bewegenden Proteine treffen an der Grenze der beiden Gele auf den hohen

Widerstand des engporigen Trenngels. In diesem Übergangsbereich zwischen Sammel- und Trenngel werden die Proteinbanden nochmals aufkonzentriert. Das niedrigmolekulare Glycin wandert im Trenngel schneller als die Proteine, so dass diese sich nun in einem homogenen Puffermilieu befinden, was die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße ermöglicht (Berg *et al.*, 2003; Engels und Lottspeich, 2006).

Mit Hilfe eines Gießstandes wurde zuerst das Trenngel gegossen und anschließend das Sammelgel (Tabelle 24).

Tabelle 24: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE

	Trenngel (15 % Acrylamid) für 2 Gele	Sammelgel (5 % Acrylamid) für 2 Gele
Acrylamid (30 %)	5 ml	0,66 ml
ddH ₂ O	2,3 ml	2,18 ml
1,5 M Tris	2,5 ml	-
0,5 M Tris	-	1 ml
SDS (10%)	100 µl	40 µl
APS (10%)	100 µl	40 µl
TEMED	10 µl	6 µl

	Trenngel (10 % Acrylamid) für 2 Gele	Sammelgel (4 % Acrylamid) für 2 Gele
Acrylamid (30 %)	3,28 ml	0,5 ml
ddH ₂ O	4 ml	2,4 ml
1,5 M Tris	2,46 ml	-
0,5 M Tris	-	1 ml
SDS (10%)	100 µl	40 µl
APS (10%)	100 µl	40 µl
TEMED	10 µl	6 µl

Hierfür wurden jeweils eine dicke Glasplatte (mit *Spacern*) und eine dünne Glasplatte mit Isopropanol entfettet und im Gießstand befestigt. Das Trenngel wurde zusammen pipettiert

und zügig bis zur $\frac{3}{4}$ -Höhe der Platten eingefüllt. Zum Glätten der Oberfläche wurden einige Tropfen *n*-Butanol auf pipettiert. Nach dem Polymerisieren wurde das *n*-Butanol mit Filterpapier vollständig entfernt. Nun wurde das vorbereitete Sammelgel bis zur Oberkante der Platten eingefüllt und anschließend der Probenkamm eingebracht. Nach vollständiger Polymerisation wurden jeweils 2 Gele in einen Plattenhalter einer Elektrophoresekammer gestellt. Die Kammer wurde mit 1 x Elektrophoresepuffer befüllt und anschließend der Probenkamm vorsichtig herausgezogen.

Zum Nachweis der Cytochrom P450-Enzyme wurden Mikrosomen verwendet und für den Nachweis des AhR ein Komplet-Zellysat (Herstellung siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Die Mikrosomen wurden mit ddH₂O verdünnt, so dass alle Proben den gleichen Proteingehalt von 50 µg pro 15 µl aufwiesen. Nach Zusatz von 3 µl 6 x *Loading-Buffer* (Tabelle 25) wurden die Proben gevortext, bei 95 °C für 5 min im Thermomixer denaturiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert. Danach wurden 15 µl Probe in eine Geltasche pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker diente der Precision ± Protein™ Kaleidoscope™ (BioRad). Davon wurden jeweils 5 µl in eine Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 140 V für 1 ½ h durchgeführt.

Tabelle 25: Zusammensetzung 6 x *Loading-Buffer*

6 x *Loading-Buffer*

Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	25 ml
SDS	0,62 g
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	0,8 g
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
ad 100 ml mit ddH ₂ O; Lagerung 4°C	

3.6.5 Western Blot und Immunoblot

Um die nun aufgetrennten Proteine zu detektieren wurde die Methode des *semi-dry blots* angewendet. Bei diesem Verfahren werden durch eine angelegte Spannung die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Im vorliegenden Fall handelte es sich um eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran. Die Proteine wurden mittels proteinspezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

Für die Arbeit wurde eine *semi-dry-blot*-Apparatur verwendet, die aus zwei Plattenelektroden besteht zwischen denen ein Stapel aus Filterpapier, Membran und Gel eingelegt wurde. Die Membran (6,5 x 9 cm) wurde kurz in Methanol aktiviert und im Anodenpuffer II äquilibriert. Anschließend wurde der Blotting-Stapel aufgebaut. Dazu wurde das mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapier (7 x 9,5 cm) auf die mit Anodenpuffer I benetzte Anode gelegt. Darauf folgten zwei mit Anodenpuffer II getränkte Papiere und als nächstes die aktivierte Membran. Dann folgte das Gel, das mit drei, mit Kathodenpuffer getränkten Papieren abgedeckt wurde. Eventuelle entstandene Luftbläschen wurden durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab herausgedrückt. Mit der Kathode wurde die Apparatur verschlossen und mit einem Gewicht beschwert. Der Protein-Transfer vom Gel auf die Membran dauerte 75 min bei 45 mA pro Membran.

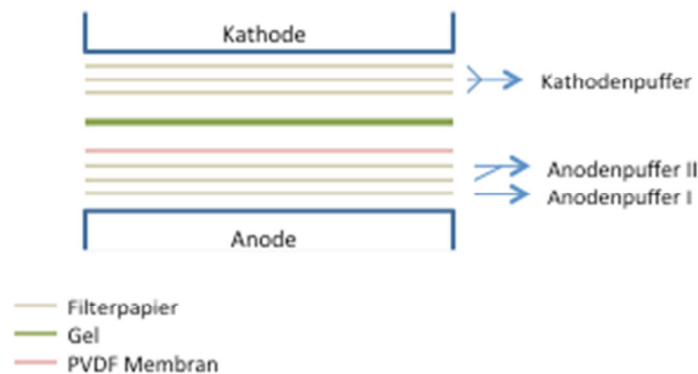


Abbildung 30: Schematischer Aufbau des *semi-dry blotting*-Stapels

Zum Nachweis der Proteine bedient man sich der Methode des Immunoblot. Bei diesem Verfahren können bestimmte Proteine mittels Immunglobulin (IgG) oder monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzym-gekoppelter Immunoblot verwendet. Dabei wird ein mit einem Enzym, meist die Meerretichperoxidase, markierter sekundärer Antikörper, der gegen den spezifisch bindenden primären Antikörper gerichtet ist, eingesetzt. Durch die Enzym-Substrat-Reaktion der Peroxidase mit Luminol wird die Chemilumineszenzdetektion ermöglicht.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran in ca. 10 ml Blockingpuffer (5 % Milchpulver-Suspension) 1 h lang bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Dabei blocken die inerten Proteine des Milchpulvers unspezifische Bindungsstellen. Nicht gebundene Bestandteile werden mit Hilfe des Detergenz Tween-20 entfernt. Zum Schluss wurde die Membran mit dem zuvor mit 5 %iger Milchpulver-Suspension verdünnten, primären und spezifisch gegen das Zielantigen gerichteten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Einzelheiten zu den verwendeten Antikörpern sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: Im Immunoblot eingesetzte Antikörper

Protein	Spezies	Verdünnung in TBS-T mit/ohne 5% Milchpulver	Katalog-Nr.	Firma
Ah-Rezeptor (H-211)	h, m, r	1:500 mit Milchpulver	Sc-5579	Santa Cruz Biotechnologie
CYP1A1 (H-70)	h, m, r	1:1000 mit Milchpulver	Sc-20772	Santa Cruz Biotechnologie
CYP1A2 (D1tkt5)	h, m, r	1:1000 mit Milchpulver	Sc-53241	Santa Cruz Biotechnologie
CYP1B1 (H-105)	h, m, r	1:1000 mit Milchpulver	Sc-32882	Santa Cruz Biotechnologie
VDAC	h, m, r	1:1000 mit Milchpulver	4866	Cell Signaling
Aktin (H-300)	h, m, r	1:1000 mit Milchpulver	Sc-10731	Santa Cruz Biotechnologie
Goat anti-mouse		1:3000 ohne Milchpulver	Sc-2005	Santa Cruz Biotechnologie
Goat anti-rabbit		1:3000 ohne Milchpulver	Sc-2004	Santa Cruz Biotechnologie

m=Maus, r=Ratte, h=Mensch

Tabelle 27: Zusammensetzung 20 x TBS

20 x TBS

NaCl	304 g
Tris	97 g
ad 2 l mit ddH ₂ O; pH 7,4	

Tabelle 28: Zusammensetzung 0,1 % TBS-T

0,1 % TBS-T

1x TBS	ad 2 l
Tween 20	2 ml

Nach der Inkubation mit dem Primär-Antikörper wurde die Membran dreimal mit 0,1 % TBS-T jeweils 5 min lang gewaschen um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert, der spezies-spezifisch an einer konstanten Region des Primär-Antikörpers bindet. Dieser ist mit der Meerretichperoxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation des Luminols katalysiert. Die Membran wurde 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 0,1 % TBS-T und einmal mit 1 x TBS gewaschen.

Nach dem Waschen folgte sofort die Detektion der Chemolumineszenz mittels Enzym-Substrat-Reaktion. Die Membran wurde dazu mit einer Mischung von 9 ml Lösung A, 1 ml *p*-Coumarinsäure und 100 µl Lösung B 1 min inkubiert. Die Meerretichperoxidase katalysiert im alkalischen Milieu die Bildung eines angeregten 3-Aminophthalat aus Luminol. Beim Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand emittiert das 3-Aminophthalat blaugrünes Licht, dessen Intensitätsmaximum bei einer Wellenlänge von 428 nm liegt (Abbildung 31) (Berg *et al.*, 2003; Geckeler und Eckstein, 1998).

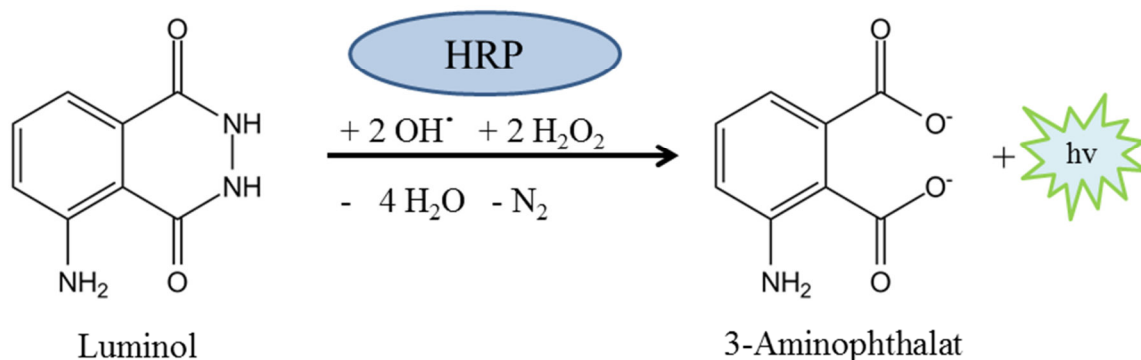


Abbildung 31: Chemolumineszenzreaktion

Mit einem Lumi-Imager und der Software Lumi-Analyst 3.1 (Roche Diagnostics) wurde die Chemolumineszenz detektiert.

Tabelle 29: Zusammensetzung Chemilumineszenz-Detektionsreagenz

0,1 M Tris-HCl

Tris	2,428 g
ad 200 ml mit ddH ₂ O; pH 8,6	

Tabelle 30: Zusammensetzung Lösung A und B

Lösung A

Luminol	50 mg
---------	-------

In 200 ml 0,1 M Tris lösen;

Lagerung bei 4 °C

Lösung B

0,1 M Tris-HCl	1 ml
----------------	------

H ₂ O ₂ (30%)	50 µl
-------------------------------------	-------

Tabelle 31: Zusammensetzung *p*-Coumarinsäure

***p*-Coumarinsäure**

<i>p</i> -Coumarinsäure	22 mg
-------------------------	-------

in 20 ml DMSO lösen;

Lagerung bei RT, dunkel

Im Anschluss an die Detektion wurden die Membranen im Kühlschrank in 1 x TBS gelagert. Um mehrere Proteine auf derselben Membran nachweisen zu können, wurde die Membran für 20 min bei 50 °C in Stripping-Puffer (Tabelle 32) inkubiert. Danach wurde die Membran sechs mal 5 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen. Der Immunoblot erfolgte ab dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen in Milchpulver-Lösung.

Tabelle 32: Zusammensetzung Stripping-Puffer

Stripping-Puffer

Tris	757 mg
SDS	10 ml 20% ige-Lösung
β-Mercaptoethanol	700 µl
ad 100 ml mit ddH ₂ O	

3.6.7 Ethoxyresorufin-*O*-deethylase-Assay (EROD) nach Kennedy

Der Ethoxyresorufin-*O*-deethylase Assay (EROD) ist eine weitverbreitete, schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung der Aktivität der Cyp1a/CYP1A-Enzyme. In der vorliegenden Arbeit wird eine nach Kennedy modifizierte Methode verwendet (Kennedy und Jones, 1994). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Aktivität und die Proteinkonzentration in einem Lauf auf der gleichen Platte gemessen werden können.

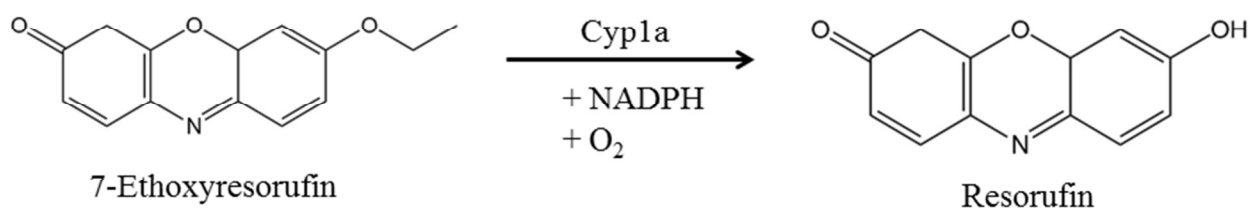


Abbildung 32: Umsetzung von Ethoxyresorufin zu Resorufin

Die Grundlage des EROD ist die Cyp1a-katalysierte oxidative Desalkylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin, das anschließend fluorometrisch gemessen werden kann. Dabei setzt die Monooxygenase Cyp1a unter NADPH-Verbrauch durch Abspalten der Alkylgruppe von Ethoxyresorufin das fluoreszierende Resorufin frei. Anhand einer Resorufin-Standardreihe wird die Umsetzung bestimmt (Kennedy und Jones, 1994).

Anschließend wird der Proteingehalt der Proben durch Zugabe von Fluorescamin bestimmt. Hierbei bildet sich ein Komplex aus Protein und Fluorescamin, der dann fluorometrisch vermessen wird. Anhand einer BSA-Standardreihe werden die Proteingehalte bestimmt. Die Aktivität wird in pmol Resorufin pro mg Protein und Minute angegeben (Kennedy und Jones, 1994).

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und gelagert. Die Arbeiten fanden bei geringer Lichteinwirkung statt, da die Substrate lichtempfindlich sind. Zuerst wurde nach dem in Tabelle 33 gezeigten Pipettierschema eine Standardreihenplatte auf einer 96-Well-Platte erstellt und anschließend im Fluoroskan bei 37 °C nach kurzer Inkubationszeit vermessen. Das NADPH und die Stop-Lösung wurden über die Dispenser des Gerätes dazu pipettiert. Das entstandene Resorufin wurde bei einer Extinktionswellenlänge (EX) von 544 nm und einer Emissionswellenlänge (EM) von 590 nm vermessen, die Proteinbestimmung erfolgte bei der Extinktionswellenlänge 390 nm und der Emissionswellenlänge 460 nm.

Tabelle 33: Pipettierschema für Standardreihenplatte

	Kontrolle	Stan. 1	Stan. 2	Stan. 3	Stan. 4	Stan. 5	Stan. 6	Blank	leer
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	NaPi 125	114	101	83	66	50	15	135	-
B	NADPH 10	10	10	10	10	10	10	-	-
C	ER 25	25	25	25	25	25	25	25	-
D	BSA -	10	20	30	40	50	60	-	-
E	Reso. -	1	4	12	19	25	50	-	-
F	Stop-Lsg. 65	65	65	65	65	65	65	65	-

NaPi = Na-Phosphat-Puffer; ER = Ethoxyresorufin; BSA = *bovine serum albumine*; Reso.: Resorufin

Um einen gleichen Proteingehalt der Mikrosomensuspension zu gewährleisten, wurden die Mikrosomensuspension auf einen Proteingehalt von 5 µg/µl eingestellt. Für die Messplatte wurde zunächst 122 µl NaPi-Puffer in jedes Well einer 96 Well-Platte vorgelegt und anschließend 3 µl Mikrosomen hinzugefügt. Dann wurden 25 µl der Ethoxyresorufin-Arbeitslösung zugesetzt und die Platte wurde anschließend im Plattenreader 10 min bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu starten, wurde die NADPH-Lösung über die Dispenser in die Wells pipettiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Fluorescamin-haltiger Stop-Lösung beendet, wobei zu beachten war, dass die Zugabe der Stop-Lösung in jedem Well nach der gleichen Zeitspanne erfolgte. Die Dispensierzeiten mussten dementsprechend angepasst werden. Danach folgte die Messung bei den oben angegebenen Wellenlängen. Mit Hilfe einer Standardreihe der unten aufgeführten Protein- und Resorufingehalte wurden Kalibriergeraden angefertigt. Anhand der Geradengleichungen können die Resorufin- und Proteingehalte der Proben bestimmt werden. Bezieht man die Resorufingehalte auf die Proteingehalte der jeweiligen Probe und teilt diese durch die Inkubationszeit von 10 min erhält man die Aktivität in pmol/(min * mg Protein) (Abbildung 33).

$$\text{Aktivität [pmol/min * mg]} = \frac{\text{pmol Resorufin im Well}}{\text{Reaktionszeit (10 min)* mg Protein pro Well}}$$

Abbildung 33: Formel zur Berechnung der EROD-Aktivität

Tabelle 34: Protein- und Resorufingehalte pro Well der Standardreihen

Reihe	Protein [mg/Well]	Resorufin [pmol/Well]
1	0	0
2	0,02	7
3	0,04	28
4	0,06	84
5	0,08	133
6	0,1	175
7	0,12	350

Im Folgenden sind die verwendeten Puffer und Lösungen für den EROD aufgeführt.

Stammlösungen:

Tabelle 35: Zusammensetzung der Ethoxyresorufin Stammlösung

Ethoxyresorufin Stammlösung (1,05 mM)

253 µg Ethoxyresorufin pro 1 ml MeOH

Gesamtmenge: 10 mg Ethoxyresorufin in 39,536 ml MeOH lösen und 500 µl Aliquots herstellen

Lagerung: -20 °C

Tabelle 36: Zusammensetzung der Fluorescamin-Stop-Lösung Stammlösung

Fluorescamin-Stop-Lösung Stammlösung (300 µg/ml)

100 mg Fluorescamin pro 333 ml Acetonitril (HPLC grade)

Lagerung: abgedunkelt bei 4 °C

Tabelle 37: Zusammensetzung der Resorufin-Kalibrierlösung Stammlösung

Resorufin-Kalibrierlösung Stammlösung (140 µM)

33 mg Na-Resorufin pro Liter in MeOH

Lagerung: abgedunkelt bei 4 °C

Arbeitslösungen:

Tabelle 38: Zusammensetzung der Fluorescamin-Stop-Lösung Arbeitslösung

Fluorescamin-Stop-Lösung Arbeitslösung (150 µg/ml)

1:1 Verdünnung der Stammlösung mit Acetonitril (HPLC grade)

Pro Platte: 4 ml Stammlösung + 4 ml Acetonitril

Lagerung: abgedunkelt bei 4 °C

Vor Gebrauch auf RT erwärmen

Tabelle 39: Zusammensetzung der Ethoxyresorufin Arbeitslösung

Ethoxyresorufin Arbeitslösung

1:30 Verdünnung mit NaPi-Puffer

Pro Platte: 90 µl Ethoxyresorufin Stammlösung + 2,61 ml NaPi
mischen

Lagerung: auf Eis

Vor Gebrauch frisch ansetzen

Tabelle 40: Zusammensetzung des NaPi-Puffer

Na-Phosphat-Puffer (NaPi)Na₂HPO₄*2H₂O 8,437 g (47,4 mM)NaH₂PO₄*H₂O 359 mg (2,6 mM)

ad 1 l; pH 8,0; Lagerung bei 4 °C

Tabelle 41: Zusammensetzung der NADPH-Lösung**NADPH-Lösung (13,4 mM)**

11,2 mg Na₄-NADPH / ml in NaPi

aliquotieren, möglichst keine Einfrier-Auftau-Zyklen

Lagerung: abgedunkelt bei -20 °C

Tabelle 42: Zusammensetzung BSA-Kalibrierlösung**BSA-Kalibrierlösung**

2 mg/ ml in NaPi

Aliquotieren in 1 ml-Portionen

Lagerung: -20 °C

Tabelle 43: Zusammensetzung Resorufin Kalibrierlösung**Resorufin Kalibrierlösung**

1:20 Verdünnung mit NaPi

Pro Kalibrierplatte: 50 µl Stammlösung Resorufin + 950 µl NaPi

Unmittelbar vor der Messung der Kalibrierplatte frisch ansetzen

3.7 Statistische Auswertung

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte bestimmt. Aufgrund der geringen Anzahl männlicher AhR-defizienter Mäuse (Kontrolle und TCDD-Behandlung) wurden die Mittelwerte und die Spannweite berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software San Diego, USA). Zur Bestimmung der Differenz zwischen Kontrolle und Behandlung sowie zwischen zwei verschiedener Genotypen wurde der one-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur angewendet. Statistische Signifikante Effekte werden in dieser Arbeit wie folgt gekennzeichnet:

*, #, °, + = $p \leq 0.05$ (statistisch signifikant),

** , ##, °°, ++ = $p \leq 0.01$ (statistische hochsignifikant),

***, ###, °°°, +++ = $p \leq 0.001$ (statistisch extrem signifikant).

4. Ergebnisse der Tierstudie

4.1 Genotypisierung

Bevor die Mäuse behandelt wurden, musste zunächst der Genotyp der Tiere überprüft werden. Aus Gewebeproben von Ohr oder Schwanz wurde DNA isoliert und durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Anschließend wurde durch Agarose-Gelelektrophorese die PCR-Amplifikate der Größe nach aufgetrennt. In den Tabellen 44 und 45 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese zusammengefasst. Homozygote AhR-Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) weisen eine Bande bei 380 Basenpaaren (bp) auf, homozygote AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}) eine Bande bei 500 bp auf. Heterozygote AhR-Mäuse (AhR^{+/-}) haben beide Banden bei 380 und 500 bp. Heterozygote Tiere sind in den Tabellen nicht dargestellt, da sie nur für die Zucht verwendet und nicht in den eigentlichen Tierversuch einbezogen wurden.

Tabelle 44 zeigt die Genotypisierungsergebnisse der im Tierversuch verwendeten weiblichen Tiere.

Tabelle 44: Genotypisierungsergebnisse der verwendeten weiblichen Tiere; Wt = AhR-Wildtyp- und KO = AhR-defiziente-Mäuse

Maus-Nr.	4301	4302	4304	4306	5205	5302	5303	6203
500 bp								
380 bp								
Genotyp	KO	Wt	KO	KO	KO	Wt	Wt	Wt

Maus-Nr.	8101	8102	9402	11401	12301	12302	RK 12	RK 13
500 bp								
380 bp								
Genotyp	KO	KO	KO	KO	Wt	Wt	Wt	Wt

Das Ergebnis der Elektrophorese zeigt, dass bei den Mäusen mit den Nummern 4301, 4304, 4306, 5205, 8101, 8102, 9402 und 11401 nur die Bande bei 500 bp vorkam. Somit gehören diese zum Genotyp „AhR-defizient“. Bei den Mäusen mit den Nummern 4302, 5302, 5303, 6203, 12301, 12302, RK 12 und RK 13 war die Bande bei 380 bp zu sehen, so dass diese

Tiere zum Genotyp „AhR-Wildtyp“ gezählt werden können. In der folgenden Tabelle sind die Genotypisierungsergebnisse verwendeter männlicher Mäuse aufgeführt.

Tabelle 45: Genotypisierungsergebnisse der verwendeten männlichen Tiere; Wt = AhR-Wildtyp und KO = AhR-defiziente Mäuse

Maus-Nr.	1202	6205	6402	8104	8207	9403	12505	22304
500 bp								
380 bp								
Genotyp	KO	Wt	KO	Wt	Wt	KO	Wt	Wt

Maus-Nr.	33205	RK 17
500 bp		
380 bp		
Genotyp	KO	Wt

In den Mäusen mit den Nummern 6205, 8104, 8207, 12505, 22304 und RK 17 war nur die Bande bei 380 bp vorhanden. Sie zählen somit zum Genotyp „AhR-Wildtyp“. Die Mäuse mit den Nummern 1202, 6402, 9403, 33205 waren, aufgrund der Bande bei 500 bp, AhR-defiziente-Mäuse. Da nur wenige männliche AhR^{-/-}-Mäuse in der Zucht vorhanden waren, konnten für den Versuch nur vier Tiere verwendet werden.

4.2 Behandlung der Tiere

Nach Bestimmung des Genotyps wurden die Mäuse in zwei Behandlungsgruppen pro Genotyp eingeteilt und per Schlundsonde einmalig entweder mit TCDD (25 µg/kg KG) oder mit Maiskeimöl als Vehikelkontrolle behandelt. Die Anzahl der Tiere pro Geschlecht, deren Genotyp und die Behandlung sind in Tabelle 46 aufgelistet. Die Mäuse wurden nach fünf Tagen mit einer Überdosis Pentobarbital anästhesiert und Leber, Niere, Lunge und Milz sowie Blut wurden entnommen. Für weitere Experimente wurden die Organe direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Das Blut wurde separat aufgearbeitet. Weitere Einzelheiten bezüglich der Zucht und der Behandlung der Tiere sowie die Blut- und Organentnahme wurden bereits in Kapitel 3.1 und 3.3 beschrieben.

Tabelle 46: Die Anzahl der Tiere pro Geschlecht, deren Genotyp und die Behandlung

Genotyp /Behandlung	AhR ^{+/+} /Maiskeimöl	AhR ^{+/+} /TCDD	AhR ^{-/-} /Maiskeimöl	AhR ^{-/-} /TCDD
Tierzahl weiblich	4	4	4	4
Tierzahl männlich	3	3	2	2

4.3 Relative Leber- und Nierengewichte

Zur Berechnung des relativen Leber- und Nierengewichtes wurde das absolute Leber- bzw. Nierengewicht in Bezug zum Körpergewicht der Maus nach der Behandlung gesetzt und in % des Körpergewichtes angegeben. Die relativen Lebergewichte weiblicher Mäuse wurden der Dissertation von Frau Dr. Christiane Lohr entnommen (Lohr, 2013). In den weiblichen AhR^{+/+}-Mäusen wurden die relativen Leber- und Nierengewichte in beiden Behandlungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von vier, in den männlichen AhR^{+/+}-Mäusen in beiden Behandlungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von drei und in den männlichen AhR^{-/-}-Mäusen in beiden Behandlungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von zwei berechnet. Aufgrund der geringen Anzahl männlicher AhR^{-/-}-Mäuse wurde beim Vergleich der Behandlungsgruppen auf die Statistik verzichtet, ebenso beim Vergleich der Genotypen männlicher Mäuse. Sämtliche Ergebnisse männlicher AhR^{-/-}-Mäuse sind als Mittelwerte mit Spannweiten abgebildet, die restlichen Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

4.3.1 Relative Lebergewichte

In Abbildung 34 ist eine entblutete Leber einer fünf Monate alten AhR^{-/-}- (AhR-Knockout) Maus im Vergleich zu einer entbluteten Leber einer fünf Monate alten AhR^{+/+}- (AhR-Wildtyp) Maus zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die AhR^{-/-}-Leber eine marmorierte, schwammartige Struktur aufwies. Die Leber der AhR-Wildtyp-Maus dagegen wies eine normale helle Oberfläche ohne marmorierte Struktur auf.

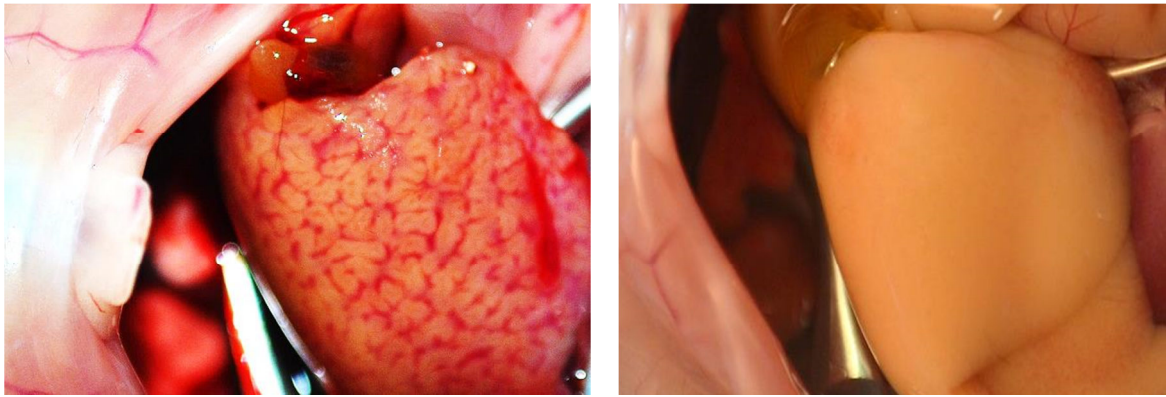


Abbildung 34: Foto einer entbluteten Leber einer fünf Monate alten AhR-defizienten Maus (links) im Vergleich zu einer Leber einer fünf Monate alten AhR-Wildtyp-Maus (rechts)

Schmidt *et al.* (1996) beobachtete ebenfalls eine marmorierte Struktur der Leber bei AhR-defizienten-Mäusen (Ersatz des 2. Exon des AhR-Gens), allerdings nur bei Mäusen, die eine Woche alt waren. Diese schwammartige Struktur war bei Neugeborenen und den meisten zwei Wochen alten oder älteren Mäusen nicht bzw. nicht mehr zu erkennen. Histologische Untersuchungen der Lebern von einer Woche alten AhR-defizienten-Mäusen bei Schmidt *et al.* (1996) zeigten eine erhebliche mikrovesikuläre Einlagerung von Fett in den Hepatozyten und eine ausgedehnte extramedulläre Hämatopoese im Vergleich zu AhR^{+/+}-Mäusen. Die Fetteinlagerung erwies sich als lückenhaft und nicht durchweg periportal oder perizentral. In drei Wochen alten Mäusen war die Fetteinlagerung nicht mehr sichtbar, nur vereinzelte hämatopoetische Zellen waren zu erkennen (Schmidt *et al.*, 1996). Fernandez-Salguero *et al.* (1995) konnten zeigen, dass AhR^{-/-}-Mäuse im Portaltrakt der Leber eine ausgeprägte Fibrose entwickelten. Dies war bereits drei Wochen nach der Geburt sichtbar. Des Weiteren konnte eine leichte Entzündung des Gallenganges festgestellt werden. Es wurde vermutet, dass der Auslöser für diese Fibrose in der Portalregion der Leber eine gestörte Retinoid-Homöostase war. Dabei kam es zu einer Ansammlung von Retinoiden in den Lebern und einem verminderten Retinsäure-Metabolismus (Andreola *et al.*, 1997, 2004; Fernandez-Salguero, 1997; Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Peterson, 2000). Die ausgeprägte Fibrose sowie die hämatopoetischen Zellen könnten die Ursache für die marmorierte Oberflächenstruktur der AhR-Knockout Leber sein.

In Abbildung 35 ist das relative mittlere Lebergewicht männlicher Mäuse dargestellt. Beim Vergleich AhR-Wildtyp-Kontrolle (4,47 % ± 0,10 %) mit AhR^{-/-}-Kontrolle (3,46 % ± 0,72 %) war ein geringeres mittleres Lebergewicht in AhR-defizienten Mäusen zu beobachten. Schmidt *et al.* (1996) berichteten, dass AhR^{-/-}-Mäuse eine bis zu 25 % kleinere Leber aufwiesen als ihre AhR^{+/+}-Wurfgeschwister. Das verminderte Lebergewicht AhR-defizienter-Mäuse ist mit einer verminderten Größe der Hepatozyten verknüpft, ein Resultat des Portosystemischen Shunts der AhR^{-/-}-Mäuse (Lahvis *et al.*, 2000).

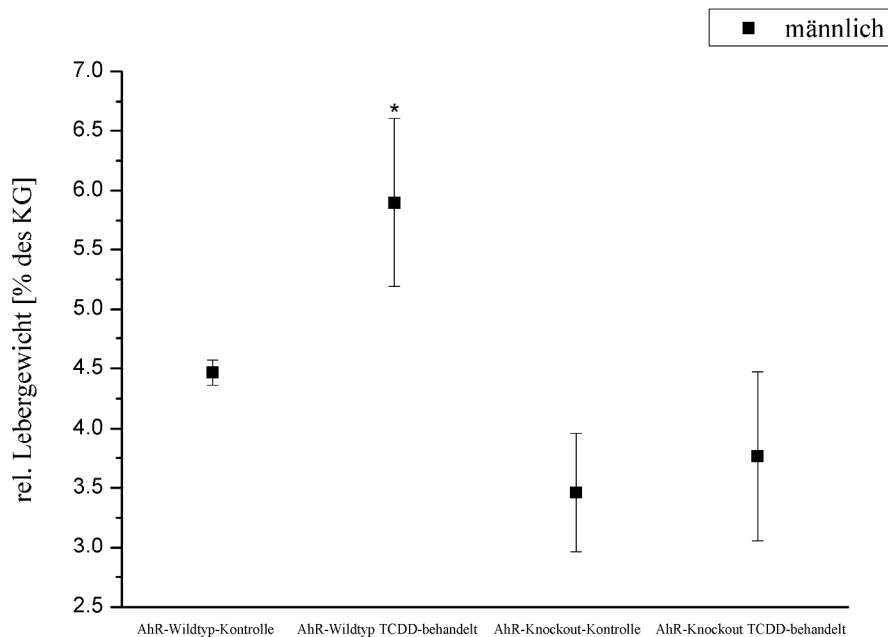


Abbildung 35: Relatives mittleres Lebergewicht männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen für männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte \pm Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle vs. AhR-Wildtyp TCDD-behandelt)

Durch Behandlung mit TCDD kam es in männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des relativen mittleren Lebergewichtes auf $5,9 \% \pm 0,71\%$. Dies ist auf die Verfettung der Leber durch Einlagerung von Triglyceriden zurückzuführen (Lee *et al.*, 2010). Boverhof *et al.* (2006) konnten ebenfalls zeigen, dass durch Behandlung männlicher AhR-Wildtyp-Mäuse mit TCDD (100 und 300 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) die relativen Lebergewichte signifikant anstiegen. Bei geringeren TCDD-Dosen (0,001 bis 10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) wurden keine Auswirkungen auf die Lebergewicht beobachtet.

In TCDD-behandelten AhR-Knockout-Tieren kam es zu einer leichten, aber nicht signifikanten Zunahme des relativen mittleren Lebergewichtes auf $3,76 \% \pm 0,71\%$.

In Abbildung 36 ist das relative mittlere Lebergewicht von männlichen und weiblichen Versuchstieren dargestellt. Die Werte der weiblichen Tiere wurden aus der Dissertation von Dr. Christiane Lohr übernommen (Lohr, 2013). Beim Vergleich der Lebergewichte weiblicher ($4,41 \% \pm 0,24 \%$) (Lohr, 2013) mit männlichen AhR-Wildtyp-Kontrollmäusen ($4,47 \% \pm 0,10 \%$) zeigten sich nur geringe Unterschiede. Nach Behandlung mit TCDD nahmen die Lebergewichte weiblicher AhR^{+/+}-Tiere ($6,52 \% \pm 0,29 \%$) (Lohr, 2013) im Vergleich zu männlichen Tieren ($5,9 \% \pm 0,71 \%$) stärker zu. Aufgrund der hohen Standardabweichung war dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern jedoch nicht signifikant.

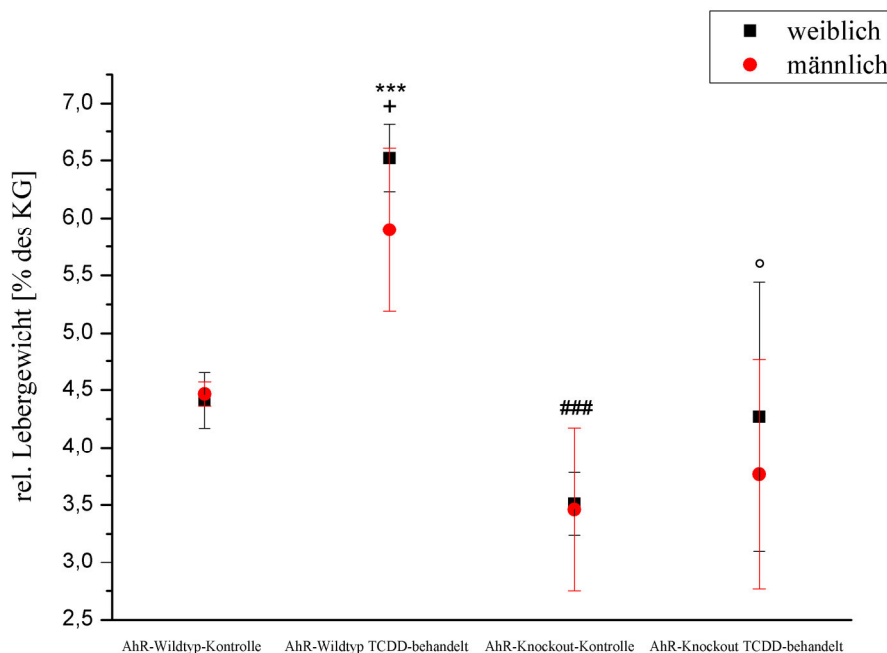


Abbildung 36: Vergleich des relativen mittleren Lebergewichtes von männlichen und weiblichen Mäusen (Ergebnisse der weiblichen Tiere aus Lohr, 2013); Mittelwerte \pm Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie für weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte \pm Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; ### = $p \leq 0,001$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle weiblich vs. AhR-Knockout-Kontrolle weiblich); *** = $p \leq 0,001$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle weiblich vs. AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich); + = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle männlich vs. AhR-Wildtyp TCDD-behandelt männlich); ° = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

In AhR-defizienten-Kontrollmäusen war zwischen weiblichen (3,51 % \pm 0,27%) und männlichen Mäusen (3,46 % \pm 0,71 %) nur ein geringer Unterschied festzustellen. Durch Behandlung mit TCDD war auch in den Weibchen (4,27 % \pm 1,17 %) eine stärkere Zunahme des relativen mittleren Lebergewichtes zu registrieren als in den Männchen (3,76 % \pm 0,99 %). Der Vergleich der relativen Lebergewichte behandelter, weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse mit denen von behandelten weiblichen AhR-Knockout-Mäusen zeigte einen signifikanten Unterschied. Die relativen Lebergewichte behandelter AhR^{+/+}-Mäuse waren signifikant höher als die relativen Lebergewichte behandelter AhR^{-/-}-Mäuse.

4.3.2 Relatives Nierengewicht

In Abbildung 37 ist das relative mittlere Nierengewicht weiblicher Mäuse dargestellt. Ein Vergleich der Oberflächenstruktur zeigte keine Unterschiede in der äußerlichen Erscheinung der Nieren beider Genotypen. In der Studie von Schmidt *et al.* (1996) konnten ebenfalls keine äußerlichen Unterschiede der Nieren AhR-defizienter-Mäuse im Vergleich zu AhR-Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Lahvis *et al.* (2000) zeigten an mit Resin retrograd perfundierten

Nieren, dass sich die Gefäßarchitektur der Nieren AhR-defizienter-Mäuse von den AhR^{+/+}-Mäusen unterschied. Eine physiologische Erklärung dafür konnte bisher nicht gefunden werden (Lahvis *et al.*, 2000). Dies lässt darauf schließen, dass der AhR auch in der Entwicklung der Niere eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

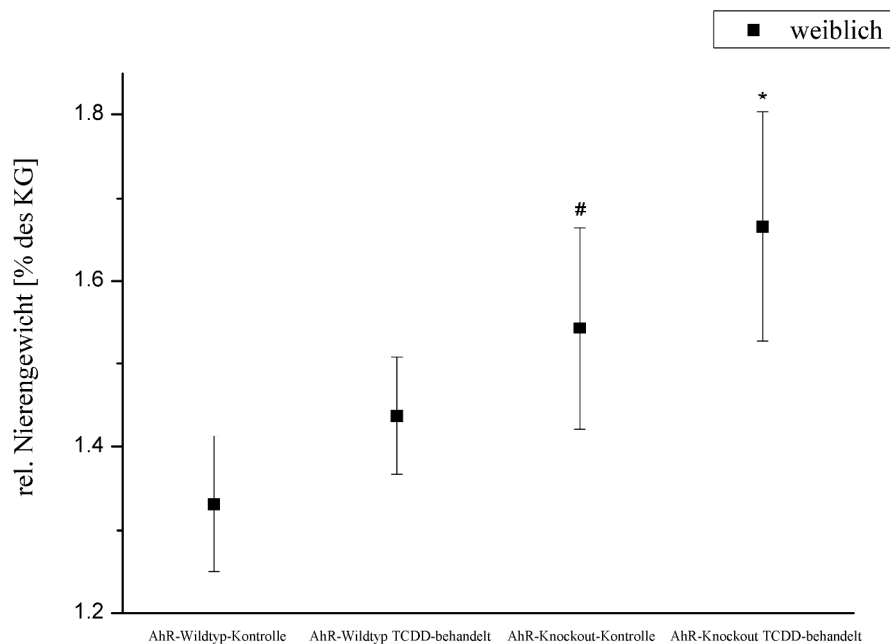


Abbildung 37: Relatives mittleres Nierengewicht weiblicher Mäuse; n= 4; Mittelwerte ± Standardabweichungen; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle vs. AhR-Knockout-Kontrolle); * = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

Ein Vergleich zeigt, dass das mittlere Nierengewicht weiblicher AhR-Wildtyp-Kontrollmäuse (1,33 % ± 0,08 %) signifikant niedriger war als das weiblicher AhR-Knockout-Kontrollmäuse (1,54 % ± 0,12 %). In einer Studie von Harrill *et al.* (2013) war das relative Nierengewicht von Wildtyp-Mäusen beider Geschlechter ebenfalls geringer als das weiblicher wie auch männlicher AhR-Knockout-Mäuse. Dies konnte auch in einer Studie von Lin *et al.* (2001) beobachtet werden. Hier wiesen die Nieren männlicher AhR^{-/-}-Mäuse ein höheres Gewicht auf als männliche Wildtyp-Mäuse. Die Zunahme des Nierengewichtes während der TCDD-Behandlung könnte auf die Bildung von vakuolären Zellen sowie von Nekrose im renalen Tubulus der Nieren zurückzuführen sein (Lin *et al.*, 2011).

Durch Behandlung der Mäuse mit TCDD kam es in AhR^{+/+}-und AhR^{-/-}-Mäusen zu einer leichten, aber nicht signifikanten Zunahme der Nierengewichte. Der Vergleich zwischen den beiden behandelten Genotypen zeigte ein signifikant höheres mittleres Nierengewicht in den AhR-defizienten Mäusen.

In Abbildung 38 ist das relative mittlere Nierengewicht männlicher Tiere dokumentiert. Durch Behandlung mit TCDD nahmen die Nierengewichte männlicher Wildtyp-Tiere leicht zu, in männlichen Knockout-Mäusen dagegen leicht ab.

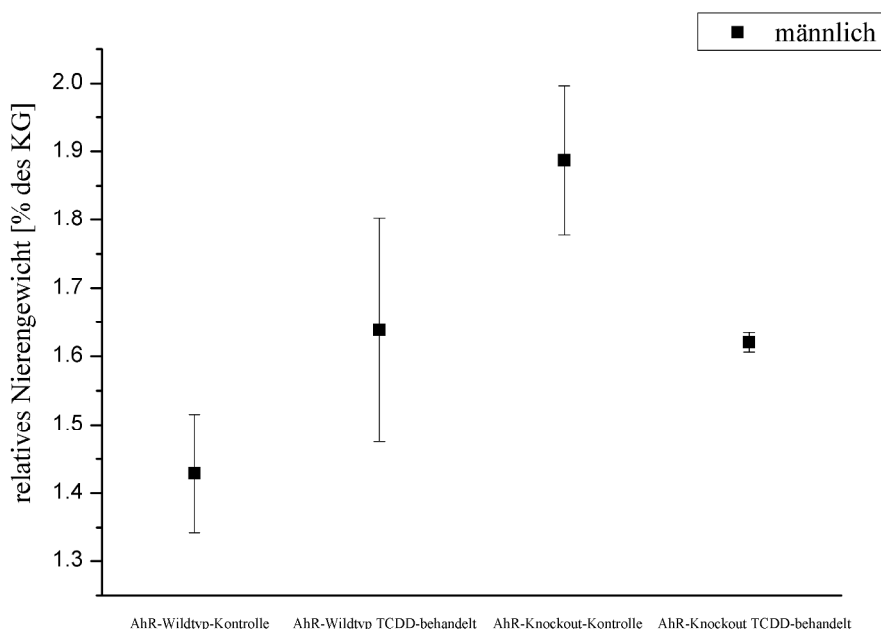


Abbildung 38: Relatives mittleres Nierengewicht männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen für männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte \pm Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt;

Der Vergleich der beiden Genotypen zeigt, dass die relativen Nierengewichte in AhR-Knockout-Kontrolltieren (1,89 % \pm 0,15 %) höher waren als die der AhR-Wildtyp-Kontrolltiere (1,43 % \pm 0,09 %). Dagegen war zwischen den Werten behandelter AhR^{+/+}- (1,64 % \pm 0,16 %) und denen behandelter AhR^{-/-}-Tiere (1,62 % \pm 0,02 %) kein Unterschied festzustellen.

In Abbildung 39 sind die relativen Nierengewichte weiblicher und männlicher Tiere dargestellt. Ein Vergleich weiblicher mit männlichen AhR-Wildtyp-Kontrollmäusen zeigte einen leichten Unterschied in den relativen Nierengewichten. Das relative mittlere Nierengewicht der Männchen (1,43 % \pm 0,09 %) war etwas höher als das der Weibchen (1,33 % \pm 0,08 %).

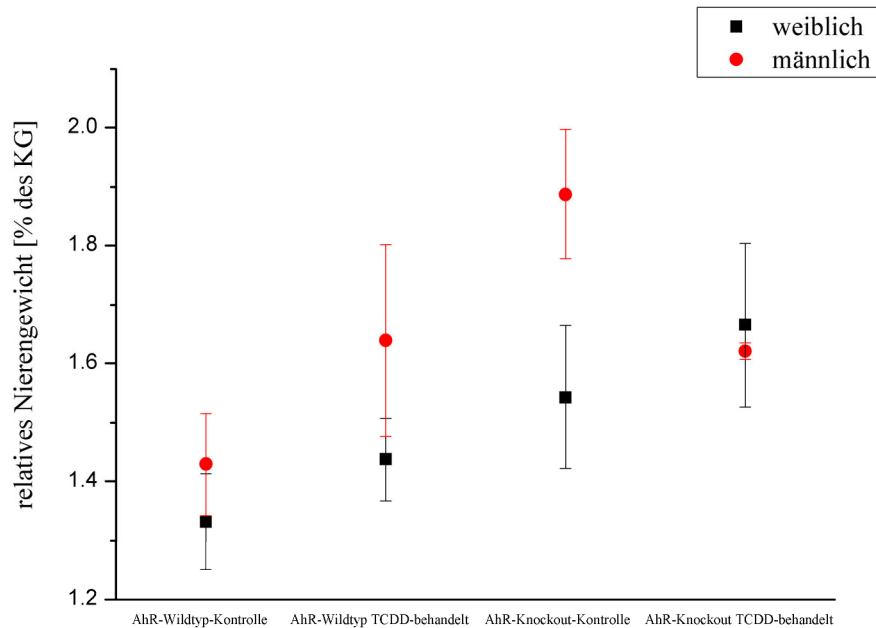


Abbildung 39: Vergleich der relativen Nierengewichte weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte \pm Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur

Das gleiche Ergebnis zeigten die Werte der AhR-Knockout-Kontrolltiere. In einer Studie von Harrill *et al.* (2013) wurde jedoch gezeigt, dass das mittlere relative Nierengewicht in weiblichen Wildtyp- und in AhR-Knockout-Mäusen etwas höher war als in männlichen Tieren. In TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäusen war das relative mittlere Nierengewicht bei den Männchen (1,64 % \pm 0,16 %) höher als bei den Weibchen (1,44 % \pm 0,07), während in behandelten AhR^{-/-}-Mäusen der geschlechtsspezifische Unterschied kleiner war.

4.4 EROD-Assay in Leber, Niere, Lunge und Milz

Nach Behandlung der Mäuse mit TCDD wurde die metabolische Aktivität von Cytochrom-P450-Enzymen in den unterschiedlichen Organen mittels EROD-Assay, modifiziert nach Kennedy (Kennedy and Jones, 1994), gemessen.

4.4.1 Leber

Da ein erheblicher Teil der zu erwartenden biologischen Wirkungen von TCDD in Zusammenhang mit dessen Metabolisierung steht (Poland und Knutson, 1982), wurde speziell die Leber wegen ihrer hohen metabolischen Kapazität als Hauptzielorgan untersucht.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der EROD-Assays für Lebermikrosomen **weiblicher** und **männlicher** Tiere gezeigt. Die Auswertung zeigt, dass sowohl in der weiblichen wie auch in der männlichen AhR^{+/+}-Kontrolle eine geringe basale EROD-Aktivität zu beobachten war, was mit früheren Untersuchungen im Einklang steht (Quattrochi *et al.*, 1994). In weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen kam es unter Einwirkung von TCDD zu einer hochsignifikanten Steigerung der EROD-Aktivität auf 2303 ± 601 pmol/(min * mg Protein). In einer Studie von Schmidt *et al.* (1996) konnte ebenfalls eine Erhöhung der EROD-Aktivität in den Lebern von Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit TCDD nachgewiesen werden. Auch in TCDD-behandelten männlichen AhR^{+/+}-Mäusen war eine hochsignifikante Zunahme der EROD-Aktivität zu erkennen.

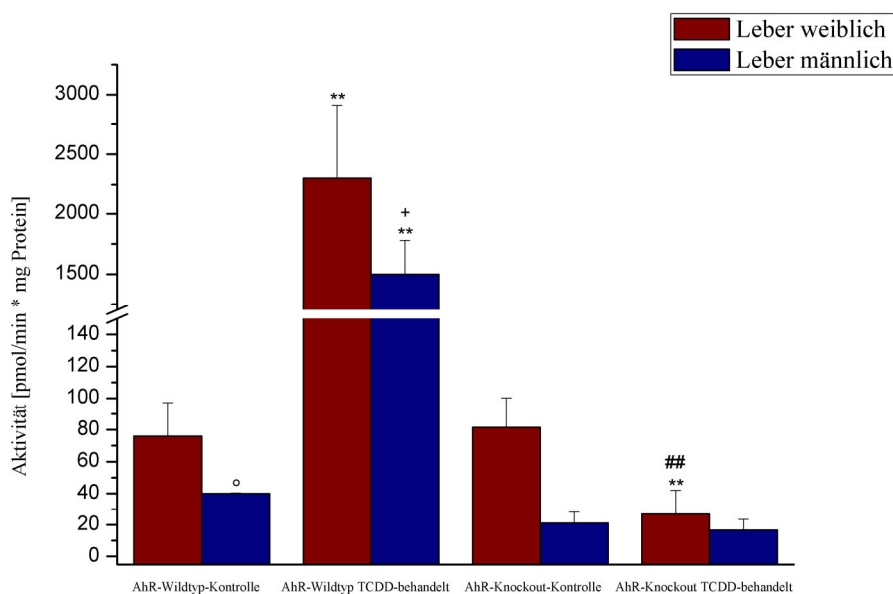


Abbildung 40: EROD-Aktivität in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie für weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich); ° = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle weiblich vs. männlich); + = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. männlich)

Ein Vergleich der weiblichen AhR^{+/+}- mit der weiblichen AhR^{-/-}-Kontrolle zeigt, dass die EROD-Aktivität der AhR-Knockout-Kontrolle etwas höher war als die AhR-Wildtyp-Kontrolle. In männlichen Kontrolltieren war dies nicht zu beobachten. Hier lag die EROD-Aktivität der AhR^{+/+}-Mäuse etwas höher als die der AhR^{-/-}-Mäuse. In einer Studie von Schmidt *et al.* (1996) wurde dagegen beim Vergleich zwischen AhR-defizienten-Mäusen und AhR-Wildtyp-Mäusen verminderte basale EROD-Aktivitäten in AhR-Knockout-Mäusen festgestellt.

In Folge der TCDD-Behandlung kam es in den weiblichen AhR^{-/-}-Mäusen zu einer hochsignifikanten Abnahme der EROD-Aktivität. Dies war auch in den männlichen AhR-defizienten-Mäusen zu beobachten, jedoch nicht signifikant. In einer Studie von Schmidt *et*

al. (1996) konnte bei TCDD-behandelten (30 nmol/kg KG) AhR^{-/-}-Mäusen ebenfalls keine erhöhte oder verringerte EROD-Aktivität festgestellt werden.

Der Geschlechtervergleich der Kontrolltiere zeigte einen signifikanten Unterschied der EROD-Aktivitäten. Diese war in den Weibchen höher ausgeprägt als in den Männchen. Durch Verabreichung von TCDD stieg in den AhR^{+/+}-Mäusen beider Geschlechter die EROD-Aktivitäten sehr stark an, in den Weibchen signifikant höher als in den Männchen.

Ein Vergleich der EROD-Aktivitäten der weiblichen mit den männlichen Mäusen zeigt, dass die EROD-Aktivität der weiblichen Tiere beider Genotypen und Behandlungsgruppen höher war als in den männlichen Tieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass TCDD eine erhöhte EROD-Aktivität in den Lebern von Wildtyp-Mäusen bewirkte und somit den Fremdstoffmetabolismus induzierte. Dagegen war in AhR-defizienten-Mäusen keine EROD-Aktivität zu beobachten. Die EROD-Ergebnisse stehen in Einklang mit den Erwartungen, die sich durch die Genotypisierung der Mäuse ergaben.

4.4.2 Niere

Da sich die Gefäßstrukturen der Nieren AhR-defizienter-Mäuse von denen des AhR-Wildtyps unterscheiden (Lahvis *et al.*, 2000), kann man davon ausgehen, dass der AhR in der Entwicklung der Niere eine wichtige Rolle spielt. Daher wurden die Nieren als weiteres Organ ausgewählt, um TCDD-induzierte Effekte zu untersuchen.

In Abbildung 41 sind die EROD-Ergebnisse der Nierenmikrosomen **weiblicher** und **männlicher** Mäuse gezeigt. In den Nieren weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse kam es unter Einwirkung von TCDD zu einer signifikanten Zunahme der EROD-Aktivität (1925 ± 974 pmol/(min * mg Protein)). Eine hochsignifikante Zunahme der Aktivität (401 ± 85 pmol/(min * mg Protein)) war in männlichen AhR^{+/+}-Mäusen zu beobachten. Zu einem vergleichbaren Resultat kamen Amara *et al.* (2012) in männlichen C57BL/6J-Mäusen. Mit TCDD (15 µg/kg KG) behandelte Mäuse zeigten in diesen Untersuchungen eine signifikant erhöhte EROD-Aktivität in den Nieren (Amara *et al.*, 2012).

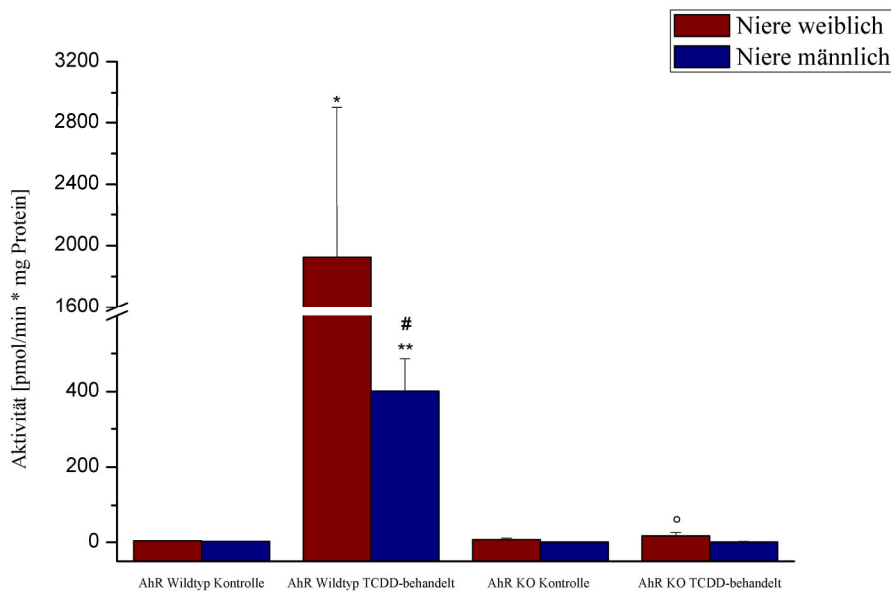


Abbildung 41: EROD-Aktivitäten in den Nieren weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie für weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle vs. AhR-Wildtyp TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt weiblich vs. männlich); ° = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

Beim Vergleich weiblicher und männlicher AhR-Kontrolltiere zeigte sich, nur ein geringer Unterschied der EROD-Aktivitäten. In TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäusen war dagegen ein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten zwischen Weibchen und Männchen zu erkennen. In AhR^{-/-}-Mäusen kam es durch TCDD-Gabe zu einer geringen, nicht signifikanten Zunahme der EROD-Aktivität. Dies war sowohl in weiblichen Tieren wie auch in männlichen Tieren zusehen. Insgesamt war die EROD-Aktivität in den Nieren weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse wie auch in AhR-defizienten-Mäusen sowohl in den Kontrollen wie auch nach TCDD Behandlung höher als in den Männchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TCDD auch in den Nieren von AhR-Wildtyp-Mäusen eine erhöhte EROD-Aktivität induzierte und somit den Fremdstoffmetabolismus in der Niere aktivierte. In AhR-defizienten-Mäusen verursachte TCDD dagegen keine erhöhten EROD-Aktivitäten. Somit kann man davon ausgehen, dass auch in den Nieren der AhR^{-/-}-Mäuse ein Knockout des Ah-Rezeptors vorliegt.

4.4.3 Lunge

Bui *et al.* (2012) berichteten, dass TCDD (50 µg/kg KG) in den Lungen von AhR-Wildtyp-Mäusen *Cyp1a1*- und *Cyp1a2*- und *Cyp1b1*-mRNA induzierte. Aus diesem Grund wurden auch die Lungen ausgewählt, um die Effekte von TCDD auf EROD-Aktivität hin zu

untersuchen. In der folgenden Abbildung 42 sind die EROD-Ergebnisse der Lungen weiblicher und männlicher Mäuse dargestellt. Vergleicht man die AhR-Wildtyp-Kontrolle mit den TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen, so war eine extrem signifikante Zunahme der EROD-Aktivität zu erkennen. Dies war auch in den männlichen Tieren zu sehen, wo es zu einer hochsignifikanten Zunahme der EROD-Aktivität kam. Eine signifikant erhöhte EROD-Aktivität konnte ebenfalls in einer Studie von Amara *et al.* (2012) in den Lungen von TCDD-behandelten (15 µg/kg KG) männlichen C57BL/6J-Mäusen beobachtet werden. Ein Vergleich der weiblichen AhR-Wildtyp-Kontrolle zur männlichen AhR-Wildtyp-Kontrolle zeigte einen signifikanten Unterschied. Die EROD-Aktivität in der weiblichen AhR^{+/+}-Kontrolle war geringer als in der männlichen AhR^{+/+}-Kontrolle. Auch bei den Werten von weiblichen und männlichen TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäusen wurde der gleiche Unterschied festgestellt.

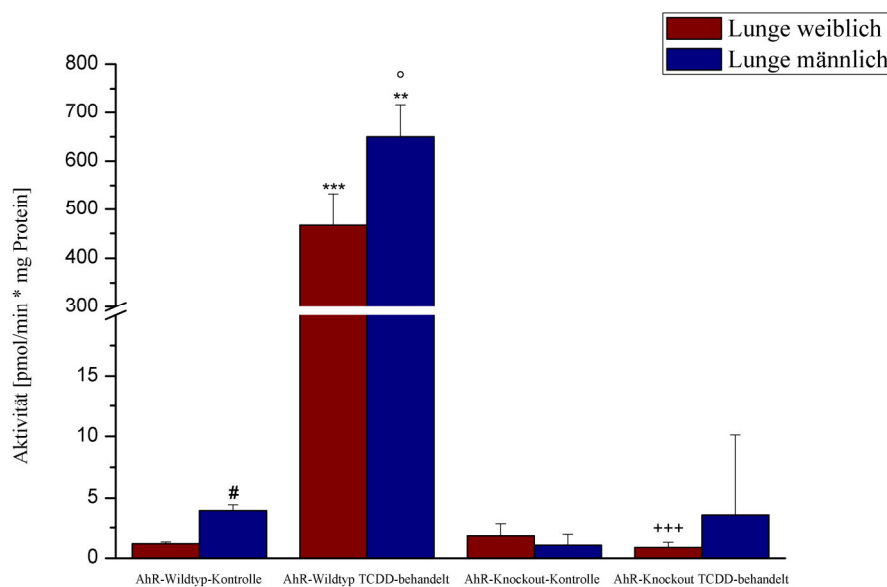


Abbildung 42: EROD-Aktivität in den Lungen weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie für weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle weiblich vs. männlich); ° = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt weiblich vs. männlich); +++ = $p \leq 0,001$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

Betrachtet man die AhR^{-/-}-Mäuse mit und ohne TCDD-Behandlung, so ist festzustellen, dass es durch TCDD-Gabe zu keiner Erhöhung der EROD-Aktivität kam. In weiblichen AhR-Knockout-Mäusen kommt es zu einer leichten Abnahme der EROD-Aktivität, wohingegen in den Männchen eine leichte Zunahme der EROD-Aktivität zu verzeichnen war. Beide Veränderungen der EROD-Aktivität waren jedoch nicht signifikant.

Zwischen weiblichen und männlichen AhR-defizienten-Kontrollmäusen ist nur ein geringer Unterschied zu erkennen, wobei die EROD-Aktivität der Weibchen etwas höher war als die der Männchen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit TCDD in AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer Steigerung der EROD-Aktivitäten führte, nicht aber in AhR-Knockout-Mäusen. Dieses Ergebnis bedeutet, dass auch in den Lungen ein Knockout des AhR vorliegt sowie, dass TCDD auch in den Lungen von AhR-Wildtyp-Mäusen die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 aktiviert.

4.4.4 Milz

Als letztes Organ wurden die Milzen auf deren EROD-Aktivität hin untersucht. Die Milzen wurde ausgewählt, da in einer Studie von Chen *et al.* (2013) belegt wurde, dass sich das relative Milzgewicht sowie die Zahl der Splenozyten in Mäusen durch TCDD-Behandlung reduzierte.

In Abbildung 43 ist die EROD-Aktivität **weiblicher** und **männlicher** Mäuse dargestellt.

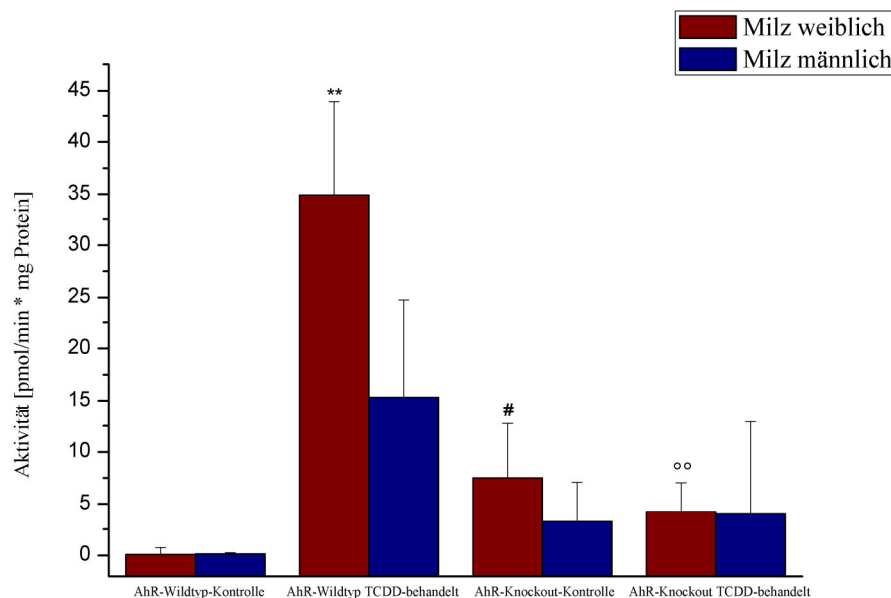


Abbildung 43: EROD-Aktivität in den Milzen weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie für weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp-Kontrolle weiblich vs. AhR-Knockout-Kontrolle weiblich); °° = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

Man erkennt, dass durch TCDD in weiblichen AhR^{+/+}-Mäusen eine hochsignifikante, in männlichen Mäusen eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der EROD-Aktivitäten zu

verzeichnen war. D. h. die Zunahme der EROD-Aktivität war in weiblichen Mäusen ausgeprägter.

In AhR^{-/-}-Mäusen kam es durch Behandlung mit TCDD sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Tieren zu keiner Erhöhung der EROD-Aktivität, jedoch ist in den Weibchen eine leichte Abnahme der EROD-Aktivität zu beobachten. In den Männchen war kein Unterschied zu erkennen.

Ein Vergleich zwischen den Genotypen zeigte in weiblichen Kontrolltieren einen signifikanten Unterschied. Die EROD-Aktivität war in der AhR-Wildtyp-Kontrolle geringer als in der AhR-Knockout-Kontrolle. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied war zwischen den TCDD-behandelten weiblichen AhR-Wildtyp und AhR-defizienten-Mäusen zu erkennen. Dieser Effekt war auch in männlichen TCDD-behandelten Tieren zu beobachten. Allerdings weniger ausgeprägt als in weiblichen Tieren. Die Ergebnisse zeigen, dass TCDD auch in den Milzen von AhR-Wildtyp-Mäusen die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 aktivierte und dass auch in den Milzen AhR-defizienter-Mäuse der Knockout vorlag.

4.5 Western Blot in Leber, Niere, Lunge und Milz

Um die EROD-Ergebnisse sowie die Genotypisierung weiter zu bestätigen, wurde eine mögliche Änderung der Proteinkonzentration der Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 als Folge der Behandlung mit TCDD mittels Western Blot in den gleichen Organen überprüft. Hierfür wurden aus den Organen Mikrosomen isoliert, auf eine Proteinkonzentration von 30 µg pro Probe eingestellt und damit eine Elektrophorese und nachfolgend ein Immunoblot durchgeführt. Darüber hinaus sollte mittels Western Blot überprüft werden, ob trotz des AhR-Knockouts ein AhR-Protein in den AhR-defizienten-Mäusen translatiert wurde. Aus den Lebergeweben wurden daher Komplett-Zelllysate hergestellt und die Proben für die Elektrophorese auf einen Proteingehalt von 50 µg eingestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Western Blot für die weiblichen und männlichen AhR-Wildtyp-Mäuse für beide Behandlungsgruppen sowie für die weiblichen AhR-defizienten-Tiere mit einem Stichprobenumfang von drei durchgeführt und für die männlichen AhR-defizienten-Tiere mit einem von zwei. Die Proteine VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) und β-Aktin dienten als Ladungskontrolle.

4.5.1 Ah-Rezeptor in den Lebern

Zunächst sollte überprüft werden, ob in den AhR-Knockout-Mäusen trotz des AhR-Knockouts ein AhR-Protein gebildet wurde. Abbildung 44 zeigt die Western Blots für

weibliche und **männliche** AhR^{+/+}- sowie AhR^{-/-}-Mäuse bei der Behandlungsgruppen mit einem Antikörper gegen den AhR.

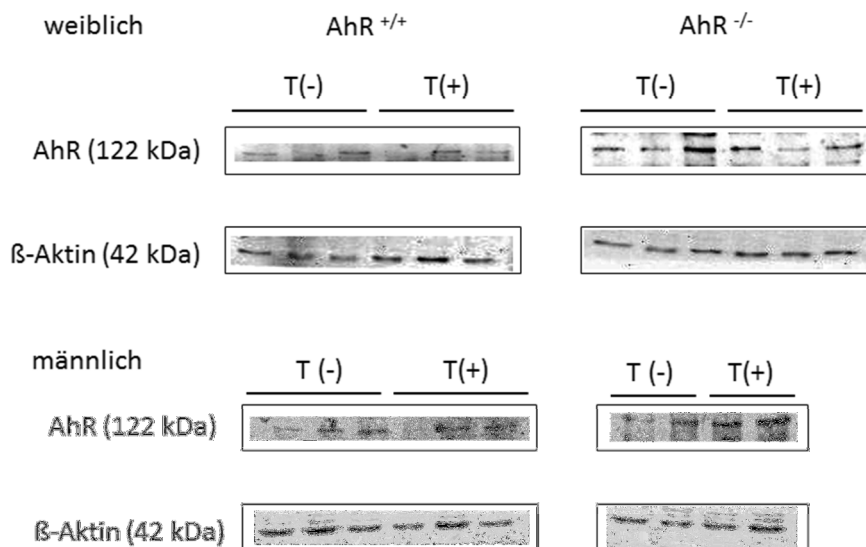


Abbildung 44: Western Blots des Ah-Rezeptors in den Lebern; 50 µg Protein pro Probe; weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); β-Aktin diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

Es ist zu erkennen, dass in weiblichen AhR^{+/+}-Mäusen sowohl in Kontrolltieren (Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl, T (-)) wie auch in TCDD-behandelten (T(+)) Mäusen eine Bande des AhR vorhanden war. Dies war auch in weiblichen AhR^{-/-}-Tieren zu beobachten. Auch hier war in allen sechs Proben eine Bande zu erkennen. Die Proteinkonzentration der Ladungskontrolle Aktin war in den einzelnen Proben nahezu konstant. In männlichen Tieren war ähnliches zu beobachten. Auch hier war sowohl in AhR^{+/+}- wie auch AhR^{-/-}-Mäusen eine Bande des AhR zu sehen.

Betrachtet man die Proteinsequenz des AhR etwas näher und schaut an welche Stelle der Proteinsequenz der Antikörper bindet, so erkennt man, dass der Knockout des AhR (Austausch des Exon 2), der in den AhR-defizienten-Tieren angewendet wurde, nicht innerhalb der Bindungsregion des verwendeten Antikörpers liegt. Die Bindungsregion des Antikörpers liegt zwischen den Aminosäuren 637-848 des humanen AhR (Santa Cruz Datenblatt des Antikörpers 2013). Daher kann der Antikörper auch an das durch den Knockout veränderte AhR-Protein binden. In Abbildung 45 ist dies schematisch dargestellt. Die bHLH-Domäne (*basic helix-loop-helix*) ist wichtig für die Dimerisierung des AhR mit ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) und für die DNA-Bindung. Codiert wird diese Domäne durch das Exon 2 (Dolwick *et al.*, 1993). In einer Studie von Schmidt *et al.* (1996) konnte dagegen im Western Blot mit drei unterschiedlichen Antikörpern gegen den Ah-Rezeptor in AhR-defizienten-Mäusen (Austausch des Exon 2) kein AhR-Protein nachgewiesen werden. Schmidt *et al.* (1996) vermutete, dass somit kein AhR-Protein in

Knockout-Mäusen gebildet wurde. Aus dem aktuellen Western Blot gegen den AhR lässt sich schließen, dass sowohl in AhR-Wildtyp-Tieren wie auch in AhR-defizienten-Tieren ein AhR gebildet wurde.

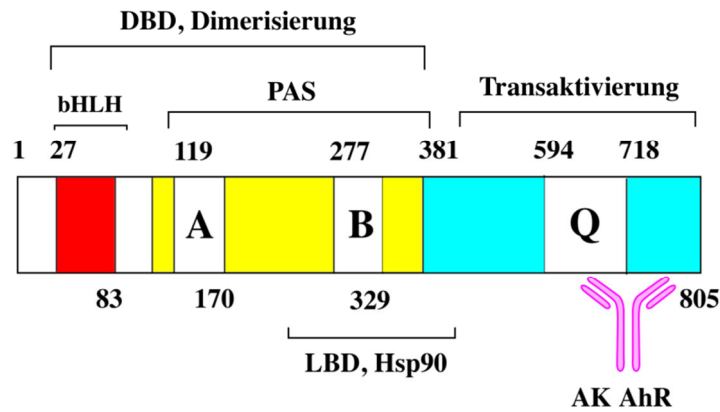


Abbildung 45: Schematische Darstellung des murinen AhR-Proteins mit Bindung des Antikörpers (modifiziert nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007)

A, B: schwach homologe repetitive Regionen
 Q: Glutamin-reiche Transaktivierungs-Domäne
 DBD: DNA-Bindungsdomäne
 LBD: Ligandenbindungsdomäne
 AK AhR: Antikörper gegen AhR

In AhR-Knockout-Tieren lag jedoch wie man aus den EROD-Ergebnissen (Kapitel 4.3) folgern kann ein **funktionaler Knockout** des AhR vor. Der funktionelle Knockout besteht darin, dass der AhR nicht mehr fähig ist, aufgrund des fehlenden Exons 2, mit ARNT zu dimerisieren. Dadurch fehlt ihm die Fähigkeit nach der Bindung von TCDD den Fremdstoffmetabolismus zu aktivieren und beteiligte Enzyme der AhR-Genbatterie wie z. B. Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 zu induzieren. Wie im EROD-Assay schon beschrieben wurde, war keine erhöhte Cyp1a-Enzymaktivität in AhR-Knockout-Mäusen nach Behandlung mit TCDD zu beobachten.

4.5.2 Cytochrom P450-Enzyme

Nun sollte die Expression der Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Organen Leber, Niere, Lunge und Milz im Western Blot überprüft werden, um die im EROD-Assay beobachteten erhöhten Enzymaktivitäten der TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäuse zu bestätigen.

4.5.2.1 Leber

Abbildung 46 zeigt die Western Blots der Proteine Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lebern von **weiblichen** AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen. Die Proteinkonzentration der Ladungskontrolle VDAC war in den einzelnen Proben nahezu konstant. Die Cyp1a1-Proteinlevel in den AhR-Wildtyp-Mäusen wurden durch TCDD deutlich erhöht.

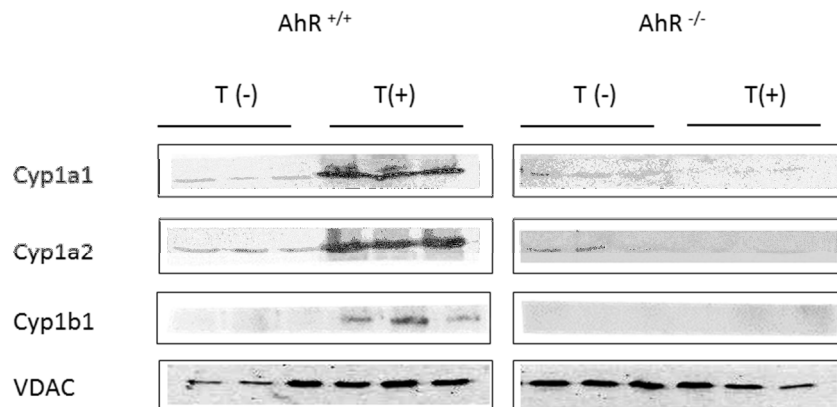


Abbildung 46: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lebern; 30 µg Mikrosomen pro Probe; weibliche AhR-Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) und AhR-defizienten-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

In den AhR-defizienten-Mäusen war dies nicht zu beobachten. Die Proteinlevel von Cyp1a2 und Cyp1b1 waren in den Lebern der AhR^{+/+}-Mäuse nach Behandlung mit TCDD ebenfalls erhöht im Vergleich zur Kontrolle. In den AhR^{-/-}-Mäusen war keine TCDD-vermittelte Induktion dieser drei Enzyme zu beobachten. Ein Vergleich der Wildtyp-Kontrollmäuse mit den AhR-defizienten-Kontrollmäusen lässt erkennen, dass in beiden Genotypen schwache Cyp1a1- und Cyp1a2-Banden zu sehen war. Diese Banden sind durch die basale Expression der Proteine zu erklären (Braeuning *et al.*, 2011). Die Western Blots der Leber bestätigen somit die EROD-Ergebnisse. Nur bei AhR^{+/+}-Mäusen war eine Erhöhung der Proteinkonzentration der Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 zu beobachten, nicht jedoch in den Lebern von AhR^{-/-}-Mäusen. In einer Studie von Schmidt *et al.* (1996) wurde ähnliches gezeigt. In TCDD (30 nmol/kg KG) behandelten Wildtyp-Mäusen wurde Cyp1a1 und Cyp1a2 in den Lebern induziert. In AhR-defizienten-Mäusen war dies in dieser Studie ebenfalls nicht zu beobachten (Schmidt *et al.*, 1996).

In Abbildung 47 sind die Western Blots der Proteine Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lebern von **männlichen** AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen gezeigt.

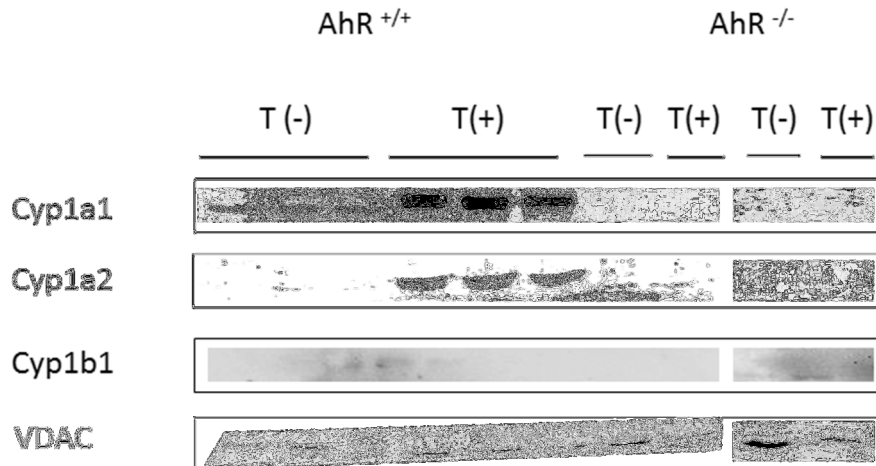


Abbildung 47: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lebern; 30 µg Mikrosomen pro Probe; männliche Ahr-Wildtyp-Mäuse (Ahr^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

In den Lebern von AhR^{+/+}-Kontrollmäusen war eine Cyp1a1-Bande zu sehen. Diese ist auf die basale Expression von Cyp1a1 in den Lebern zurückzuführen (Braeuning *et al.*, 2011). In AhR^{-/-}-Kontrollmäusen war bei keinem der drei Proteine eine Bande zu erkennen. Durch Behandlung mit TCDD kam es zu einer Induktion der Proteine Cyp1a1 und Cyp1a2 in AhR-Wildtyp-Mäusen. Dagegen kam es in den Lebern behandelter AhR-defizienter-Tiere zu keiner Induktion dieser Proteine.

Ein Vergleich der beiden Geschlechter zeigt, dass Cyp1a1 und Cyp1a2 sowohl in weiblichen wie männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen durch TCDD induziert wurde. Eine Erhöhung der Cyp1b1-Proteinkonzentration scheint dagegen nur in weiblichen AhR^{+/+}-Mäusen durch Behandlung mit TCDD vorzukommen. Die Ergebnisse der Western Blots bestätigen die Beobachtungen im EROD-Assay und bekräftigen, dass TCDD nur in Wildtyp-Mäusen den Fremdstoff-metabolismus induzierte.

4.5.2.2 Niere

Als nächstes Organ wurde die Niere im Western Blot untersucht. Abbildung 48 zeigt die Western Blots der Nieren **weiblicher** Mäuse. Die Proteinkonzentration von Cyp1a1 und Cyp1a2 sowie Cyp1b1 nahm in AhR^{+/+}-Mäusen durch Behandlung mit TCDD zu. Dies wurde in Nierenmikrosomen TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse nicht beobachtet. Hier kam es bei keinem der drei untersuchten Enzyme zu einer Erhöhung der Proteinlevel im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteinlevel der Ladungskontrolle waren in allen Proben konstant.

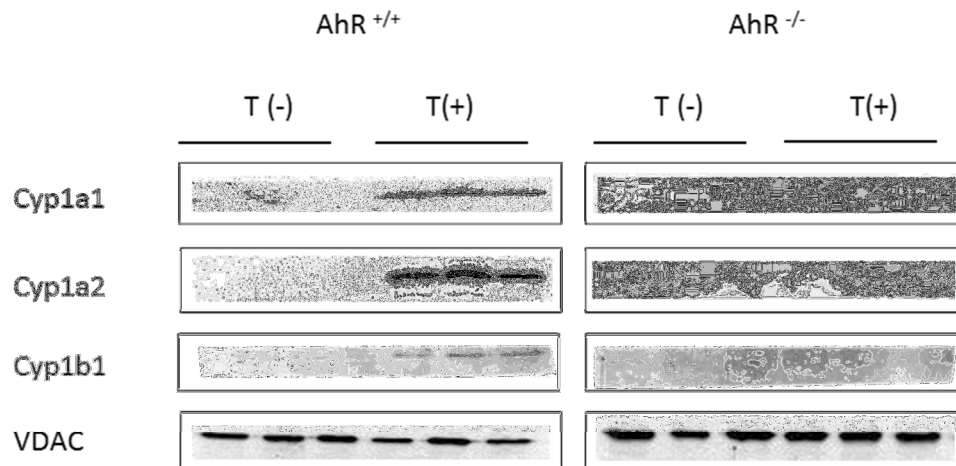


Abbildung 48: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Nieren; 30 µg Mikrosomen pro Probe; weibliche AhR-Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

Betrachtet man die Western Blots der Nieren **männlicher** Tiere (Abbildung 49), so ist zu erkennen, dass in der AhR^{+/+}-Kontrolle (T(-)) schwache Banden bei Cyp1a1 zu erkennen waren. Diese lässt sich auf die basale Induktion des Enzyms zurückführen (Braeuning *et al.*, 2011). Durch Behandlung mit TCDD kam es zu einer Steigerung der Proteinlevel der Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 bei den AhR-Wildtyp-Tieren. Eine erhöhte Cyp1a-Proteinkonzentration in den Nieren wurde in einer Studie von Amara *et al.* (2012) in TCDD-behandelten (15 µg/kg KG) männlichen C57BL/6J-Mäusen ebenfalls beobachtet. Eine erhöhte Proteinkonzentration von Cyp1b1, wie in behandelten weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen gezeigt werden konnte, wurde in behandelten männlichen Wildtyp-Mäusen nicht beobachtet. Dagegen berichteten Amara *et al.* (2012) in einer Studie an männlichen mit TCDD (15 µg/kg KG) behandelten C57BL/6J-Mäusen von erhöhten Cyp1b1-Proteinleveln in den Nieren im Vergleich zur Kontrolle.

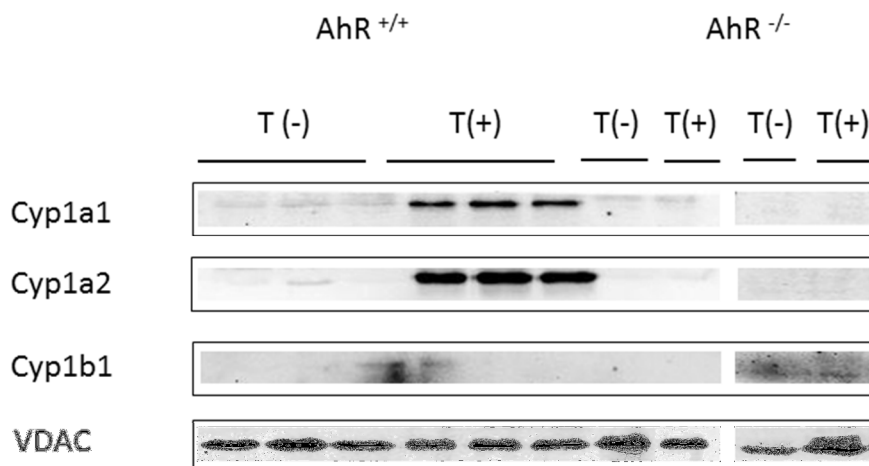


Abbildung 49: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Nieren; 30 µg Mikrosomen pro Probe; männliche Ahr-Wildtyp-Mäuse (Ahr^{+/+}) und Ahr-defiziente-Mäuse (Ahr^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

In den Ahr^{-/-}-Tieren war festzustellen, dass in zwei Tieren (T(-) und T(+)) schwache Banden bei Cyp1a1 zu sehen sind. Diese Banden sind auf die basal Induktion des Enzyms zurückzuführen (Braeuning *et al.*, 2011). Die Proteinlevel der Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 stieg durch Gabe von TCDD nicht an. Die Proteinlevel der Ladungskontrolle VDAC waren in allen zehn Proben nahezu konstant.

Ein Vergleich der Geschlechter zeigt, dass Cyp1a1 und Cyp1a2 sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Ahr^{+/+}-Mäusen durch Behandlung mit TCDD induziert wurden. Ein erhöhter Cyp1b1-Proteinlevel war dagegen nur in behandelten weiblichen Wildtyp-Mäusen zu beobachten. In TCDD-behandelten Ahr-defizienten-Mäusen kam es weder in weiblichen noch in männlichen Mäusen zu einer Induktion der Proteine Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1. Die Ergebnisse der Western Blots der Nieren bestätigen die Ergebnisse des EROD-Assays.

4.5.2.3 Lunge

In Abbildung 50 sind die Western Blots der Proteine Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lungen der **weiblichen** Mäuse dargestellt. Betrachtet man die Ahr^{+/+}-Tiere, so ist zu erkennen, dass durch Behandlung mit TCDD die Proteinkonzentration der Proteine Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 erhöht wurde. In den Ahr-Wildtyp-Kontrolltieren war bei keinem der drei Proteine eine Bande vorhanden.

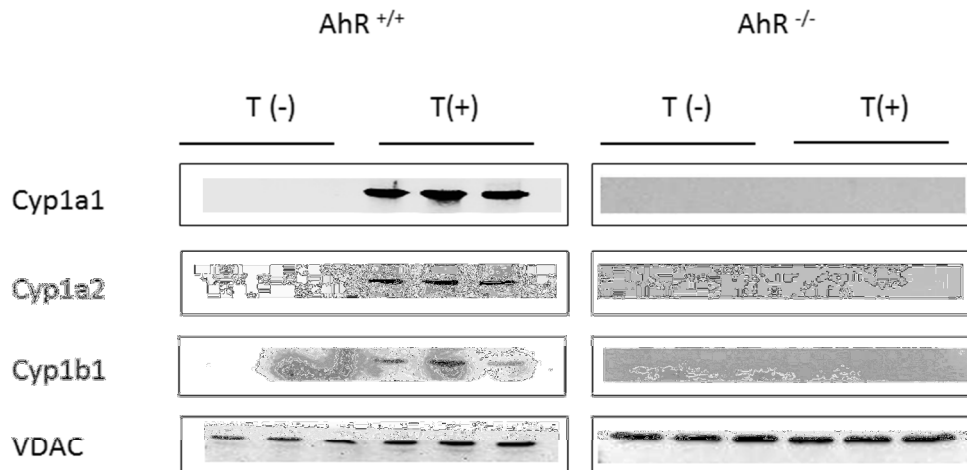


Abbildung 50: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Lungen; 30 µg Mikrosomen pro Probe; weibliche Ahr-Wildtyp-Mäuse (Ahr^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

Vergleicht man dies mit den Western Blots der AhR^{-/-}-Mäuse, so stellt man fest, dass es durch die Gabe von TCDD zu keiner Erhöhung der Proteinkonzentration der drei Proteine kam. Die Proteinkonzentrationen der Ladungskontrollen VDAC waren in den AhR^{+/+}-Tieren konstant. Dies war auch in den AhR^{-/-}-Tieren zu beobachten. Auch die Western Blots der weiblichen Lunge bestätigen die EROD-Ergebnisse.

In Abbildung 51 sind die Western Blots der Lungen der **männlichen** Tiere dargestellt.

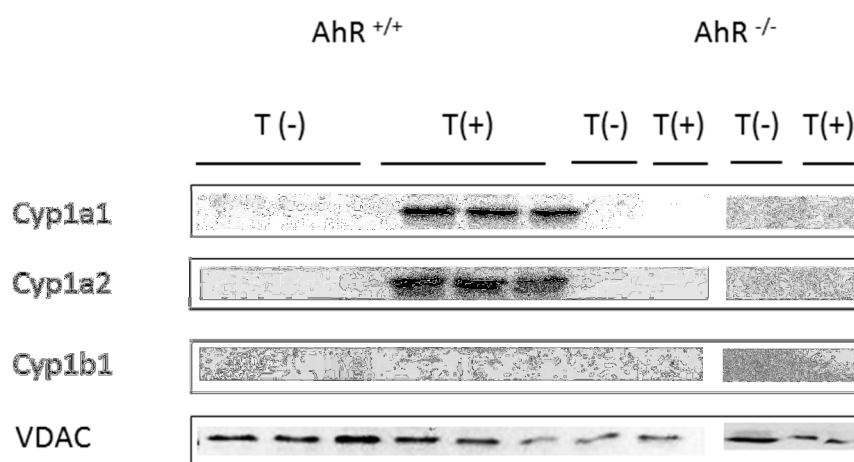


Abbildung 51: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1A2 und Cyp1B1 in den Lungen; 30 µg Mikrosomen pro Probe; männliche Ahr-Wildtyp-Mäuse (Ahr^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

Hier war, wie in den weiblichen Tieren, eine Erhöhung der Proteinkonzentration der Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 nur in den mit TCDD behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Eine erhöhte Cyp1a Proteinkonzentration konnte in einer Studie von Amara *et al.* (2012) ebenfalls in den Lungen von männlichen TCDD-behandelten (15 µg/kg KG) C57BL/6J-Mäusen beobachtet werden. Des Weiteren zeigten Amara *et al.* eine erhöhte TCDD-vermittelte Cyp1b1 Proteinkonzentration in den Lungen männlicher Mäuse (Amara *et al.*, 2012). Eine Induktion von Cyp1b1 in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen war jedoch nicht zu erkennen. In AhR-defizienten-Tieren war in allen vier Tieren bei keinem der drei Proteine eine Bande zu erkennen. Die Ladungskontrolle VDAC war nicht in allen Proben konstant. Innerhalb eines Genotyps waren die Proteinkonzentrationen der Ladungskontrolle allerdings nahezu konstant.

Das Resultat der Western Blots stützen die Ergebnisse des EROD-Assays und sind ein weiterer Hinweis für eine TCDD-vermittelte Induktion der Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 in Wildtyp-Mäusen.

4.5.2.4 Milz

In Abbildung 52 sind die Western Blots der Milzen **weiblicher** Tiere gezeigt. In AhR-Wildtyp-Kontrolltieren war bei allen drei Proteinen keine Bande zu erkennen. Durch Behandlung mit TCDD kam es zu einer Steigerung der Proteinkonzentration der Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2. In einem der TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Tiere war die Bande bei Cyp1a1 nur schwach zu sehen im Vergleich zu den beiden anderen TCDD-behandelten Tieren. Bei Cyp1b1 war nur in einem der drei TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäuse eine schwache Bande zu erkennen.

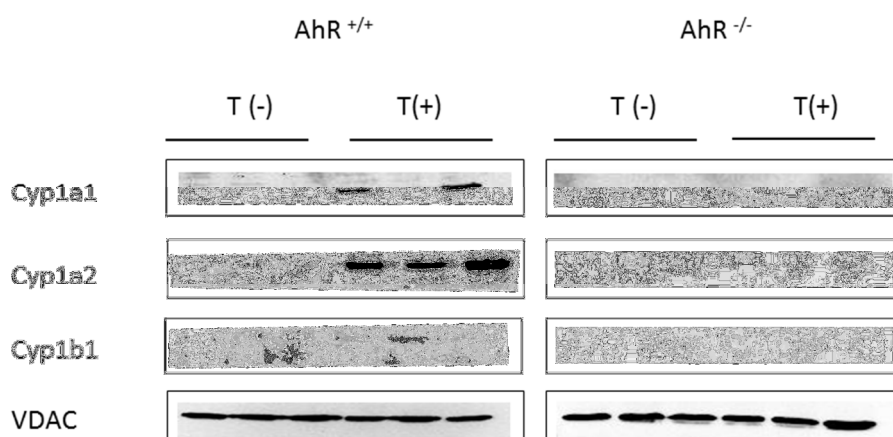


Abbildung 52: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Milzen; 30 µg Mikrosomen pro Probe; weibliche AhR-Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

Die Proteinlevel der Ladungskontrolle VDAC waren in allen zwölf Proben nahezu konstant. Die Ergebnisse des Western Blots der weiblichen Milzen passen zu den Ergebnissen des EROD-Assays. Es kam nur in behandelten AhR-Wildtyp-Tieren zu einer Steigerung der Proteinkonzentration von Cyp1a1 und Cyp1a2.

Abbildung 53 zeigt die Western Blots der Milzen **männlicher** Mäuse. Eines der AhR^{+/+}-Kontrolltiere wies eine schwache Bande bei Cyp1a1 auf. In behandelten Wildtyp-Mäusen waren nur in zwei der drei behandelten Wildtyp-Mäuse bei Cyp1a1 und Cyp1b1 schwache Banden zu erkennen. Bei Cyp1a2 kam es in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration. In den AhR-defizienten-Mäusen war sowohl in den Kontrollen wie auch in den TCDD-behandelten Tieren keine Steigerung der Proteinlevel der drei Enzyme zu verzeichnen.

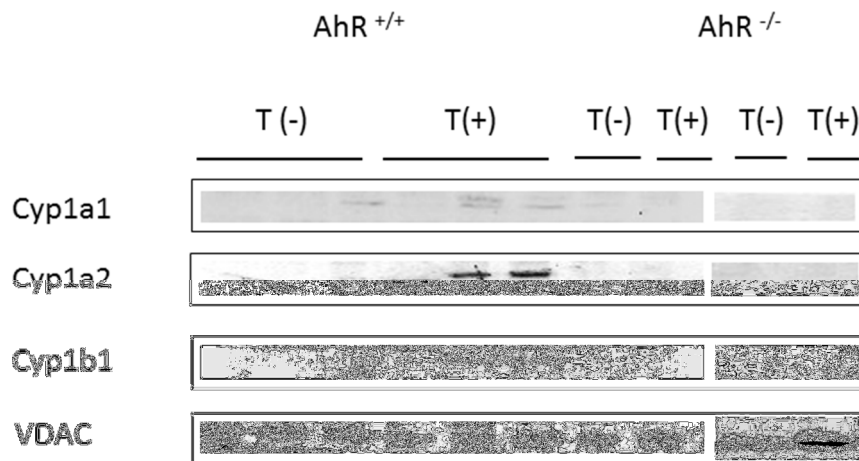


Abbildung 53: Western Blots von Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den Milzen; 30 µg Mikrosomen pro Probe; männliche AhR-Wildtyp-Mäuse (AhR^{+/+}) und AhR-defiziente-Mäuse (AhR^{-/-}); VDAC diente als Ladungskontrolle; T (-) = Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl und T (+) = Behandlung mit TCDD

Die Ergebnisse der Western Blots der männlichen Tiere bestätigen auf Proteinebene die Ergebnisse der Cyp1a-Aktivität in den EROD-Assays der männlichen und weiblichen Tiere und sind vergleichbar mit den Western Blot Ergebnissen der Weibchen. Allerdings war in den männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen nur nach Behandlung mit TCDD eine erhöhte Proteinkonzentration des Enzymes Cyp1a2 zu verzeichnen.

4.6 Microarray

In den Ergebnissen des EROD-Assays sowie den Western Blots wurden Unterschiede in der Induktion der Cytochrom P450-Enzyme in den vier untersuchten Organen (Kapitel 4.3 und 4.4) beobachtet. Um nun weitere Unterschiede nach der Behandlung mit TCDD zwischen weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen und AhR-defizienten Mäusen auf der Genexpressionsebene zu untersuchen wurden eine Microarray-Analyse der Lebern und Nieren durchgeführt. Nach der Tötung der Mäuse wurde die Lebern und Nieren entnommen. Mit einem Skalpell wurden die Organe in kleine Stücke (30 mg) geschnitten, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Microarray-Analyse nur die **Nieren** verwendet. Die Daten und Ergebnisse der Microarray-Analyse der **Lebern** wurden aus der Dissertation von Frau Dr. Christiane Lohr (Lohr, 2013) übernommen.

Um die Genexpressionsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe (Vehikelkontrolle mit Maiskeimöl) und der Behandlungsgruppe (mit TCDD 25 µg/kg KG) zu messen, wurde ein *Whole Mouse Genome Oligo Microarray 4x44K* (Agilent Technologies) verwendet. Weitere Einzelheiten bezüglich der Durchführung der Analyse sowie der Datenaufbereitung und der statistischen Analyse sind im Kapitel 3.6.1 beschrieben. Die Microarray-Ergebnisse wurden zunächst mit den *Cut-Off*-Kriterien (Signalintensität $A \geq 7$, $\log_2 \text{fold change} (\log_2 fc) \geq 1$ oder ≤ -1 , und p-Wert $\leq 0,05$) gefiltert. Die mRNA-Änderungen einer spezifischen Oligonukleotid Sequenz (*Probe*) eines Genes zeigen die mögliche hoch- oder herunter-Regulierung eines Genes an. Auf einem Agilent Microarray *Slide* sind zum Teil unterschiedliche mRNA-Sequenzen (Oligonukleotide) gespottet, die für die gleichen Gene codieren. In einigen Fällen, können nun diese mRNA-Sequenzen unterschiedlich reguliert sein. Dies wiederum führt zu unterschiedlichen $\log_2 fc$. Das Auftreten dieses Phänomens hat verschiedene Gründe. Zunächst kann dies auf die vom Hersteller verwendeten Nukleotidsequenzen zurückzuführen sein, die zu einer unterschiedlichen Bindungsaffinität der Probe auf dem *Slide* führt. Zum anderen kann auch die unterschiedliche RNA-Integrität der Proben dafür verantwortlich sein. In der hier durchgeführten Untersuchung kann die zu letztgenannte Ursache vernachlässigt werden, da vor dem Experiment mittels Bioanalyser die RNA und während des Experiments die cDNA mittels Nanodrop auf ihre Qualität hin geprüft wurde. *Fold-changes* eines Genes mit derselben *Probe* und *RefSeq accession number* (NM) wurden als Mittelwert berechnet.

4.6.1 Microarray-Ergebnisse

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse der Nieren von jeweils drei weiblichen AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen nach Verabreichung einer Einzeldosis TCDD und dem Exitus der Tiere nach

fünf Tagen zeigen eine große Anzahl an beeinflussten Genen (siehe Abbildung 54). In TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen wurden 152 Gene hoch und 20 Gene herunterreguliert. 90 Gene wurden in TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen hoch- und 235 Gene herunterreguliert.

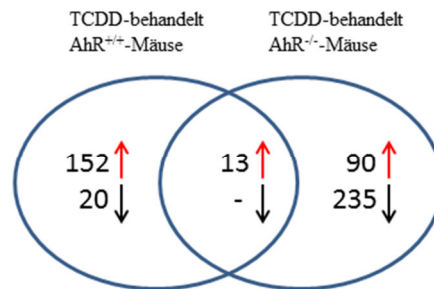


Abbildung 54: Anzahl der hoch- und runterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; Cut-off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$ oder ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$

In der Literatur sind nur sehr wenige Veröffentlichungen vorhanden, die sich mit Microarrays in AhR-defizienten Mäusen beschäftigten. Lediglich eine dieser Veröffentlichungen untersuchte die Genexpression in den Nieren mittels Microarray. Boutros *et al.* (2009) zeigte, dass durch Behandlung von AhR^{-/-}-Mäusen mit TCDD (1000 µg/kg KG) nur fünf Gene in der Niere in einem Bereich von 0,25- bis 2,5-fach reguliert wurden (Boutros *et al.*, 2009). Im Microarray der vorliegenden Arbeit wurden bedeutend mehr Gene reguliert. In AhR-defizienten-Mäusen wurden nach der TCDD-Behandlung insgesamt mehr Gene (325 Gene) als in AhR-Wildtyp-Mäusen (172 Gene) reguliert.

In den folgenden Kapiteln wird zunächst auf die zehn am stärksten regulierten Gene jedes Genotyps einzeln eingegangen. Anschließend folgt ein Vergleich ausgewählter Gene zwischen den Genotypen. Ein erster Überblick ist in einer Heatmap (Abbildung 55) dargestellt. In der Heatmap sind einige Gene aufgeführt, die in den zwei Genotypen unterschiedlich reguliert wurden. Auf Seiten der AhR^{-/-}-Mäuse fällt im Vergleich zu AhR^{+/+}-Mäusen zunächst auf, dass mehr Gene herunterreguliert (Grünfärbung) als hochreguliert (Rotfärbung) wurden. In AhR-defizienten-Mäusen fiel besonders die hohe Induktion von *Cyp24a1* auf. Bei den herunterregulierten Genen war die stark verringerte Expression von *StAR* bemerkenswert. In der Gruppe der AhR-Wildtyp-Mäuse zeigte *Cyp1a1* die höchste Induktion. In den folgenden Kapiteln werden die durch TCDD induzierten Gene in den Nieren von AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen näher betrachtet.

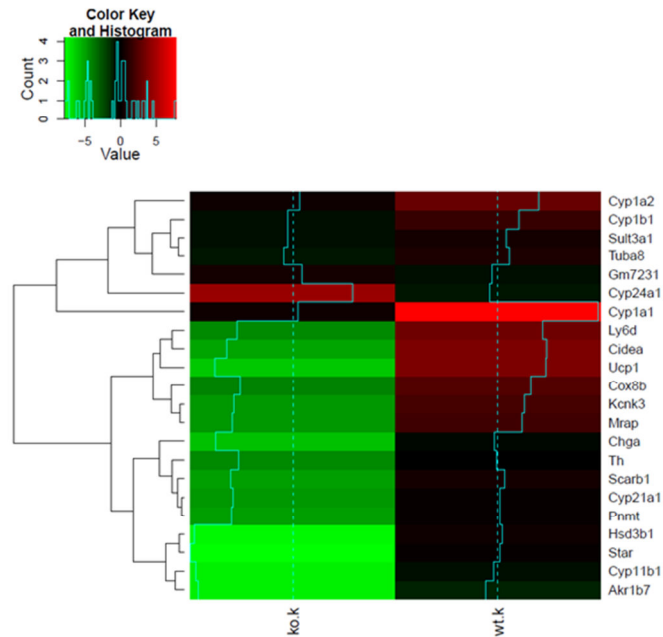


Abbildung 55: Heatmap ausgewählter Gene aus den Microarray-Daten der Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout- und AhR-Wildtyp-Mäuse; *Two times Pearson correlation, Cut-off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$ or ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$*

4.6.2 TCDD-behandelte AhR-defiziente Mäuse

Durch Behandlung mit TCDD wiesen in den Nieren AhR-defizienter-Tiere insgesamt 325 Gene eine veränderte Expression auf. Davon wurden 90 hochreguliert. Die meisten (92,2 %) der hochregulierten Gene zeigten nur eine leichte aber signifikante Erhöhung der Expression ($\log_2 fold-change$ (fc) zwischen 1 und 2). 7,8 % der Gene hatten einen $\log_2 fc > 2$. Im folgenden Kapitel wird nur eine Auswahl der zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene im Detail besprochen (siehe Tabelle 47). Im Anhang ist die vollständige Liste der regulierten Gene (siehe Tabelle 78 und 79) zu finden.

Cyp24a1 zeigte in TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäusen die höchste Expression mit einem $\log_2 fc$ von 4,57. In TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen war dagegen keine erhöhte Expression zu beobachten. *Cyp24a1* (1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase) gehört zur Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme. Es wird fast ausschließlich in der Niere exprimiert und ist ein Schlüsselenzym des Vitamin D₃-Metabolismus (Sakaki *et al.*, 2005). *Cyp24a1* katalysiert die Bildung von Calcitriol aus Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃) und von 24,25-Dihydroxycholecalciferol (24,25-dihydroxyvitamin D₃) aus Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D₃) im proximalen Tubulus der Niere (Feldman *et al.*, 2005). Reguliert wird *Cyp24a1* über den Vitamin D Rezeptor (VDR) (Dusso *et al.*, 2005).

Ein weiteres in behandelten AhR-defizienten-Mäusen hochreguliertes Gen war *Creb3l3* (*cAMP responsive element binding protein 3-like 3*), auch CREB-H genannt. *Creb3l3* ist ein leber-spezifischer Transkriptionsfaktor, der zur CREB/ATF-Familie gehört. Er bindet an das CRE- (*cyclic AMP response element*) sowie box B-Elemente der DNA und wird mit

Leberzellkarzinomen, dem Metabolismus von Triglyceriden, der Expression von Hepcidin und der Antwort auf akute Entzündungen in Verbindung gebracht (Lee, 2012; Omori *et al.*, 2001). Eine TCDD-induzierte erhöhte Expression in der Niere wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Apolipoprotein N (*ApoN*) zeigte in TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäusen mit einem $\log_2 fc$ von 2 ebenfalls eine gesteigerte Expression. *ApoN* ist ein hydrophobes 12 kDa großes Protein, das in unterschiedlichen Geweben wie Eierstöcken, Hoden, Skelettmuskel, Gebärmutter sowie Leber exprimiert wird. Es wird vermutet, dass das Apolipoprotein N in der Steroidogenese und/oder Immunregulation in den Keimdrüsen nicht-menschlicher Spezies eine Rolle spielt (O'Bryan *et al.*, 2004). Ein TCDD-vermittelter Effekt auf die *ApoN*-Expression wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen behandelter AhR^{-/-}-Mäuse war auch das Gen *Rab30* zu finden. Es gehört zur Superfamilie der Ras (*rat sarcoma*; ein G-Protein-Onkogen), die in sämtlichen Spezies von der Hefe bis zum Menschen gefunden wurden und Proteine mit einer GTPase-Aktivität codieren. Die Mitglieder der *Rab* Familie sind auf zytosolischer Seite spezifischer intrazellulärer Membranen lokalisiert und fungieren als Regulatoren spezieller Schritte im Membranverkehr (Stenmark und Olkkonen, 2001). *Igfbp2* (*Insulin-like growth factor binding protein 2*) ist das am zweit häufigsten vorkommende, zirkulierende IGFBP, und wird in etlichen Geweben von Säugetieren, aber vor allem im Glomerulus der Niere exprimiert (Jones und Clemmons, 1995; Narayanan *et al.*, 2012). Die *Igfbp2*-Konzentration korreliert positiv mit der Insulin-Sensitivität. Eine niedrige Proteinkonzentration ist ein Marker für das metabolische Syndrom (Heald *et al.*, 2006).

In behandelten Knockout-Mäusen zählte zu den am stärksten regulierten Genen auch das Gen *Ces1*. Es codiert eine Carboxylesterase, die in den meisten Geweben, vor allem in Leber in hoher Konzentration exprimiert wird. *Ces1* ist unter anderem zuständig für die Hydrolyse und Umesterung von Xenobiotika, wie Trandolapril (ACE-Hemmer), Kokain und Heroin und einiger endogener Substrate wie Estern, Thioestern oder Amidverbindungen. *Ces1* spielt möglicherweise eine Rolle im Fettsäure- und Cholesterolester-Metabolismus sowie in der Blut-Hirn-Schranke (Brzezinski *et al.*, 1997; Friedrichsen *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2012).

Das Protein Antithrombin, welches durch das Gen *Serpinc1* codiert wird, ist ein Plasma Proteaseinhibitor, der zur Superfamilie der Serpine gehört und in Leber, Niere, Lunge, Herz sowie Gehirn exprimiert wird. Antithrombin inhibiert sowohl Thrombin als auch andere aktivierte Serinproteasen des Gerinnungssystems sowie die Gerinnungsfaktoren IX und X (Huntington, 2006; Kumar *et al.*, 2013). Eine TCDD-induzierte Zunahme der Genexpression von *Serpinc1* wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Hao1 (*Hydroxyacid oxidase 1*) gehört zu den Enzymen, die ein breites Spektrum an α -Hydroxycarbonsäuren in α -Ketosäuren umwandeln (Recalcati, 2003). Ein weiteres hochreguliertes Gen war *Fgb*. Es codiert die β -Komponente des Fibrinogen, einem Glycoprotein. Fibrinogen ist ein essentieller Blutfaktor zur Erhaltung der Hämostase. Es besteht aus drei Polypeptidketten und wird nach einer Gefäßverletzung durch Thrombin in Fibrin gespalten (Davis *et al.*, 2009).

Zdhhc22 (*zinc finger, DHHC-type containing 22*) zählte ebenfalls zur Auswahl der hochregulierten Gene. Seine genaue Rolle und Funktion im Metabolismus von Nagern und Menschen ist bisher nicht bekannt.

Wie in der Einführung zu Kapitel 4.6.2 bereits angedeutet wurde, wurden von den 325 regulierten Genen 235 herunterreguliert. Davon besitzen 29,3 % einen $\log_2 fc > 2$, 70,7 % weisen einen $\log_2 fc$ zwischen 1 und 2 auf. Nachfolgend soll, analog zu den hochregulierten Genen auch hier nur auf die zehn am stärksten herunterregulierten Gene etwas genauer eingegangen werden. Das am stärksten herunterregulierte Gen war *StAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*). StAR ist ein Hormon-induziertes Protein und spielt eine Schlüsselrolle in der Steroidhormon-Biosynthese in den Gonaden, der Nebennierenrinde und den Nieren. Es ist für den Transport von Cholesterin von der äußeren Membran der Mitochondrien in die innere Mitochondrienmembran zuständig (Rone *et al.*, 2009).

Ein weiteres herunterreguliertes Gen war *Hsd3b1*. Dieses Gen codiert das Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, das eine wichtige Rolle in der Steroidhormon-Biosynthese spielt. Es katalysiert die Umwandlung von Androstenon zu β -Androstenol (Doran *et al.*, 2004). Nach der Behandlung schwangerer Ratten mit TCDD (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) wiesen in 19.5 Tage alten männlichen Rattenföten sowohl *Hsd3b1* als auch *StAR* eine verminderte Expression auf (Adamsson *et al.*, 2009). Die Daten lassen keine eindeutige Aussage zu, ob die Regulierung von *StAR* und *Hsd3b1* Ahr-unabhängig ablief.

Zu den ausgewählten herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR^{-/-}-Mäuse zählte *Cyp11b1* (Steroid-11 β -Hydroxylase 1), das ebenfalls in die Steroidhormon-Biosynthese in der Nebennierenrinde involviert ist. *Cyp11b1* katalysiert die Hydroxlierung von 11-Deoxycortisol an der 11-Position zu Cortisol (Kawamoto *et al.*, 1992).

Akr1b7 codiert eine Aldo-Keto-Reduktase, die in Säugetieren, Pflanzen, Hefe und Bakterien weitverbreitet sind. Es katalysiert die Reduktion von Prostaglandin H₂ zu Prostaglandin F_{2 α} (Jez *et al.*, 1997; Kabututu *et al.*, 2009).

Ein weiteres Gen war *Ucp1*. Es codiert das mitochondriale Uncoupling Protein 1, das in der inneren Mitochondrienmembran von braunen Fettzellen lokalisiert ist. Seine physiologische Rolle ist die Vermittlung eines regulierten, wärmeentwickelnden Protonenverlustes. Die mitochondrialen Uncoupling Proteine (Ucp) sind Mitglieder der Familie der mitochondrialen Anionen-Carrier Proteine (MACP). Ucps fördern den Anionentransfer durch die innere Membran zur äußeren Mitochondrienmembran und den Rücktransport der Protonen von der äußeren Membran durch die innere Membran. Des Weiteren reduzieren sie das mitochondriale Membranpotential in Säugetierzellen (Krauss *et al.*, 2005; Nicholls *et al.*, 1978).

Chromogranin A (*Chga*) codiert ein 48-52 kDa großes Glycoprotein, das zusammen mit Adrenalin und Noradrenalin von Chromaffinzellen des Nebennierenmarks ko-sezerniert wird. Chromogranin A ist ein Marker für kardiovaskuläre Dysfunktionen wie essentielle Hypertension, hypertrophe und dilatative Kardiomyopathie sowie Herzversagen. Außerdem

ist es ein Vorläufer der kardioaktiven Peptide Vasostatin-1 und Catestatin (Mazza *et al.*, 2010; Taupenot *et al.*, 2003).

Cidea gehörte ebenfalls zu den zehn am stärksten herunterregulierten Genen und codiert das *cell death-inducing DFF45-like effector A*-Protein, das zur Familie der CIDE- (*cell death-inducing DFF45-like effector*) Proteine gehört, die als wichtige Regulatoren vieler Aspekte des Metabolismus bekannt sind wie z. B. die Fetttröpfchen-Fusion und Fetteinlagerung in adipösem Gewebe. Lokalisiert ist *Cidea* an Lipid-Tröpfchen der Adipozyten und an das Endoplasmatische Retikulum von Hepatozyten (Gong *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008, 2014).

Pnmt codiert das Enzym Phenylethanolamin-*N*-methyltransferase, das den letzten Schritt der Catecholamin-Biosynthese katalysiert. Dabei wird Noradrenalin zu Adrenalin methyliert. Somit ist *Pnmt* essentiell für die Biosynthese des Hormons Adrenalin (Axelrod, 1962). *Mrap* codiert das kleine Transmembranprotein *Melanocortin 2 receptor-interacting*-Protein. Dieses reguliert die Bindung des Melanocortin 2 Rezeptors an die Zelloberfläche sowie die Bildung eines funktionellen Rezeptors in der Nebenniere (Chan *et al.*, 2009).

Cyp21a1 (Steroid 21-Hydroxylase) gehört zur Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme und wird in hoher Konzentration in der Nebenniere gebildet. Die Steroid 21-Hydroxylase wird zur Synthese von Mineralcorticoiden und Glucocorticoiden benötigt (Parker *et al.*, 1986).

Tabelle 47: Liste der zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter Mäuse; Cut-Off-Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$ oder ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$

Gen-Name	Gen-Beschreibung	probe Name	Systematischer Name	$\log_2 fc$
Top 10 hochreguliert				
<i>Cyp24a1</i>	<i>Cytochrome P450 family 24, subunit a, polypeptide 1</i>	A_55_P2174987	NM_145365	2.4
<i>Creb3l3</i>	<i>cAMP responsive element binding protein 3-like 3</i>	A_51_P100625	NM_133996	2.1
<i>ApoN</i>	<i>Apolipoprotein N</i>	A_55_P2183433	NM_029494	2.0
<i>Rab30</i>	<i>Member RAS oncogene family</i>	A_66_P135391	NM_008342	2.0
<i>Igfbp2</i>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 2</i>	A_51_P253481	NM_021456	2.0
<i>Ces1</i>	<i>Carboxylesterase 1</i>	A_52_P409746	NM_080844	2.0
<i>Serpinc1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor</i>	A_66_P105270	NM_010403	1.9
<i>Hao1</i>	<i>Hydroxyacid oxidase 1</i>	A_51_P428483	NM_181849	1.8
<i>Fgb</i>	<i>Fibrinogen beta chain</i>	A_55_P2097518	NM_001080943	1.8
<i>Zdhhc22</i>	<i>Zinc finger</i>	A_52_P88648	NM_009996	1.8
Top 10 herunterreguliert				
<i>Star</i>	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>	A_52_P165654	NM_011485	-7.8
<i>Hsd3b1</i>	<i>Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase</i>	A_55_P2087805	NM_008293	-7.5
<i>Cyp11b1</i>	<i>Cytochrome P450 family 11, subunit b, polypeptide 1</i>	A_55_P2156963	NM_001033229	-7.4
<i>Akr1b7</i>	<i>Aldo-keto reductase family 1</i>	A_51_P331288	NM_009731	-7.2
<i>Ucp1</i>	<i>Uncoupling protein 1 (mitochondrial)</i>	A_51_P426353	NM_009463	-5.9
<i>Chga</i>	<i>Chromogranin A</i>	A_51_P358316	NM_007693	-5.9
<i>Cidea</i>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor</i>	A_51_P199168	NM_007702	-5.1
<i>Pnmt</i>	<i>Phenylethanolamine-N-methyltransferase</i>	A_51_P513153	NM_008890	-4.7
<i>Mrap</i>	<i>Melanocortin 2 receptor accessory protein</i>	A_51_P346964	NM_029844	-4.6
<i>Cyp21a1</i>	<i>Cytochrome P450 family 21, subunit a, polypeptide 1</i>	A_55_P2140107	NM_009995	-4.6

Aufgrund des hohen Datenaufkommens in der Microarray-Analyse wurde eine *gene set enrichment*-Analyse mit topGO durchgeführt, um die Prozesse, die durch TCDD-Behandlung in AhR^{-/-}-Mäusen am häufigsten beeinflusst wurden, heraus zu filtern. Es wurde die *classic* Methode angewandt. Dabei wird, basierend auf dem Fisher's exact Test, die Häufigkeit des Auftretens eines *gene ontology* (GO) terms für jeden GO-term unabhängig berechnet. Weitere Informationen zu dieser Analyse und Methode sind in Kapitel 3.6.1.1 zu finden. In Tabelle 48 sind die 20 häufigsten GO terms und die damit verbundenen hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter Mäuse aufgeführt. Bei der Auswertung der Tabelle fällt auf, dass in einigen Prozessen wie *myeloid cell differentiation* (GO:0030099), *homeostasis of number of cells* (GO:0048872), *erythrocyte homeostasis* (GO:0034101), *erythrocyte differentiation* (GO:0030218) und *erythrocyte development* (GO:0048821) zum größten Teil die gleichen Gene involviert waren. Die drei Prozesse *erythrocyte homeostasis*, *erythrocyte differentiation* und *erythrocyte development* sind, wie in Abbildung 56 zu sehen ist, Verzweigungen des Prozesses *erythrocyte homeostasis*(GO:0034101).

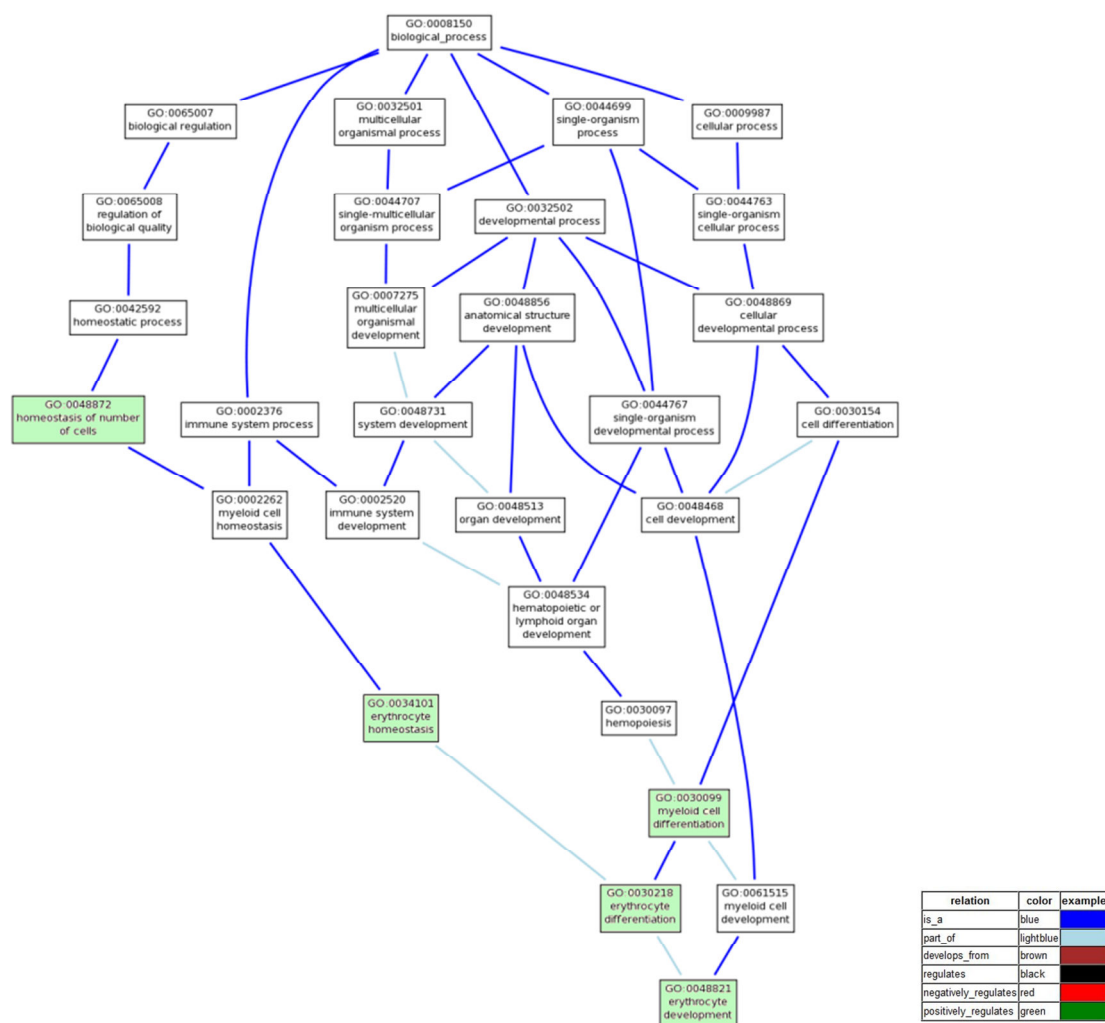


Abbildung 56: Prozess *erythrocyte homeostasis* und damit verbundene Prozesse in einem gerichteten azyklischen GO-Teilgraph zusammengefasst dargestellt; die Daten stammen aus der topGo-Analyse der Microarray-Daten der Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; die hochregulierten Prozesse sind grün hinterlegt; erstellt mit der Visualization-Software von AmiGo2

Einige andere Prozesse wie *blood coagulation* (GO:0007596), *hemostasis* (GO:0007599), *coagulation* (GO:0050817), *wound healing* (GO:0042060), *regulation of body fluid levels* (GO:0050878) wiesen ebenfalls gleiche Gene auf und können, wie in Abbildung 57 dargestellt, miteinander in Verbindung gebracht werden. Wobei der Prozess *blood coagulation* eine Verzweigung des *wound healing* ist.

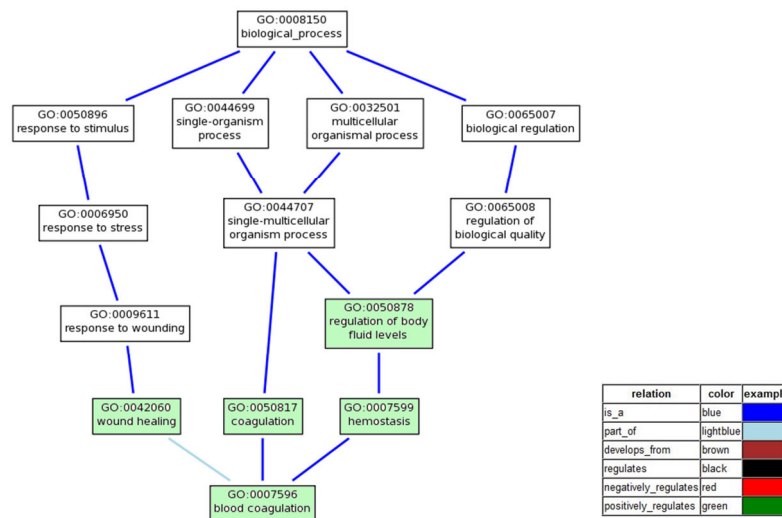


Abbildung 57: Azyklisch gerichteter *GO*-Teilgraph einiger *GO terms*, die in Verbindung miteinander stehen; die Daten stammen aus der topGo-Analyse der Microarray-Daten der Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; die hochregulierten Prozesse sind grün hinterlegt; erstellt mit der Visualizations-Software von AmiGo2

Durch TCDD-Behandlung wurde der Prozess *carboxylic acid catabolic process* (GO:0046395), der eine Verzweigung des *organic acid catabolic process* (GO:0016054) darstellt, ebenfalls hochreguliert (Abbildung 58).

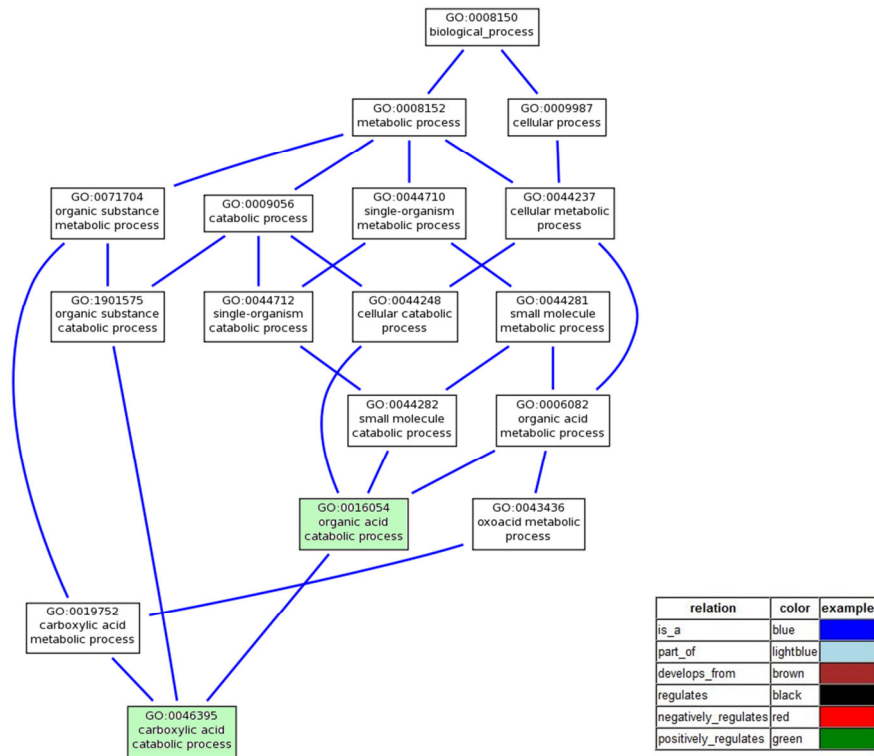


Abbildung 58: Prozess *organic acid catabolic process* in einem gerichteten azyklischen *GO*-Teilgraph zusammengefasst dargestellt; die Daten stammen aus der topGo-Analyse der Microarray-Daten der Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; die hochregulierten Prozesse sind grün hinterlegt; erstellt mit der Visualization-Software von AmiGo2

Auch Prozesse, die in die Biosynthese von Sterinen (GO:0016126, GO:0006695) involviert sind, wurden hochreguliert.

In Tabelle 49 sind die 20 am häufigsten vorkommenden *GO terms* aus der topGO-Analyse aufgeführt, die durch Behandlung mit TCDD in den Nieren AhR-defizienter-Mäuse herunterreguliert wurden. Vor allem wurden Prozesse des Lipidmetabolismus (GO:0006629, GO:0008610, GO:0044255, GO:0008202) wie zum Beispiel *fatty acid metabolic process* (GO:0006631), *acylglycerol metabolic process* (GO:0006639) und *neutral lipid metabolic process* (GO:0006638), aber auch einige biosynthetische Prozesse wie *neutral lipid biosynthetic process* (GO:0046460) und *acylglycerol biosynthetic process* (GO:0046463) herunterreguliert. Metabolische Prozesse kleiner Moleküle (GO:0044281, GO:0044283, GO:0043436, GO:0006082, GO:0042180, GO:0032787, GO:0019752, GO:0016053 und GO:0046394) sowie von Hormonen (GO:0042455) wurden durch TCDD negativ beeinflusst. In Abbildung 59 sind die Ergebnisse der topGO-Analyse für die herunterregulierten Gene in einem gerichteten azyklischen *GO*-Teilgraph zusammengefasst dargestellt.

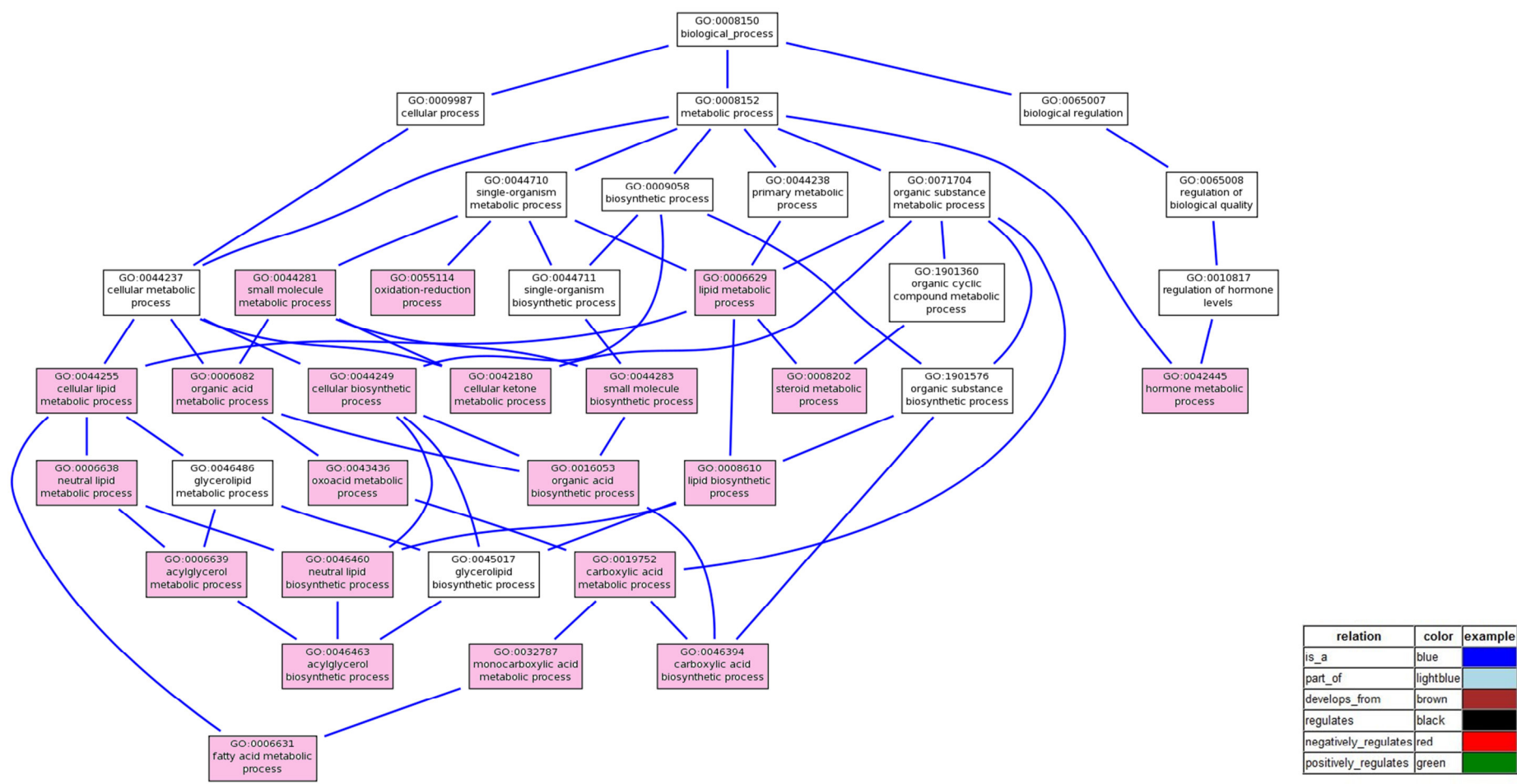


Abbildung 59: Herunterregulierte Prozesse in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse in einem gerichteten azyklischen GO-Teilgraph zusammengefasst dargestellt; die herunterregulierten Prozesse sind rosa hinterlegt; erstellt mit der Visualization-Software von AmiGo2

Tabelle 48: *Gene Ontology (GO)*-Analyse der hochregulierten Gene in den Nieren behandelter AhR-Knockout-Tiere ($A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$, p-Wert $\leq 0,05$); Erstellt mit topGO; *Classical enrichment*-Analyse zur Überprüfung der Anreicherung von *GO terms* innerhalb der Gruppe der unterschiedlich exprimierten Gene durch Fisher's exact Test.
Anmerkung: '*' Zwei einzelne *probes* von diesem Gen waren hochreguliert

	GO.ID	GO-term	Beteiligte Gene
1	GO:0048821	<i>erythrocyte development</i>	<i>Hba-a1, Hba-a2, Hbb-b1, Hbb-b2</i>
2	GO:0030218	<i>erythrocyte differentiation</i>	<i>Hba-a1, Hba-a2, Hbb-b1, Hbb-b2, Rps14</i>
3	GO:0034101	<i>erythrocyte homeostasis</i>	<i>Hba-a1, Hba-a2, Hbb-b1, Hbb-b2, Rps14</i>
4	GO:0007596	<i>blood coagulation</i>	<i>F10, Fgg, Fgb, Serpin1, Foxa2</i>
5	GO:0007599	<i>hemostasis</i>	<i>F10, Fgg, Fgb, Serpin1, Foxa2</i>
6	GO:0050817	<i>coagulation</i>	<i>F10, Fgg, Fgb, Serpin1, Foxa2</i>
7	GO:0042274	<i>ribosomal small subunit biogenesis</i>	<i>Gm4832, Gm5215, , Rps14</i>
8	GO:0006695	<i>cholesterol biosynthetic process</i>	<i>Hmgcs2, Apob</i>
9	GO:0048872	<i>homeostasis of number of cells</i>	<i>Hba-a1, Hba-a2, Hbb-b1, Hbb-b2, Rps14</i>
10	GO:0016126	<i>sterol biosynthetic process</i>	<i>Hmgcs2, Apob</i>
11	GO:0050878	<i>regulation of body fluid levels</i>	<i>F10, Fgg, Fgb, Serpin1, Foxa2</i>
12	GO:0042060	<i>wound healing</i>	<i>F10, Fgg, Fgb, Serpin1, Foxa2</i>
13	GO:0065008	<i>regulation of biological quality</i>	<i>Otc, F10, Mbl2, Fgg, Fgb, Snca, Serpin1, Apob, Hba-a1, Hba-a2, Hbb-b1, Hbb-b2, Cck, Foxa1, Foxa2, Rps14</i>
14	GO:0060479	<i>lung cell differentiation</i>	<i>Foxa1, Foxa2</i>
15	GO:0060487	<i>lung epithelial cell differentiation</i>	<i>Foxa1, Foxa2</i>
16	GO:0043933	<i>macromolecular complex subunit organization</i>	<i>Otc, Mbl2, Snca, Fgg, Fgb, Apob, Hba-a2, Cck, Gm5215, Rps14</i>
17	GO:0030099	<i>myeloid cell differentiation</i>	<i>Hba-a1, Hba-a2, Hbb-b1, Hbb-b2, Rps14</i>
18	GO:0016054	<i>organic acid catabolic process</i>	<i>Amdhd1, Fabp1, Tdo2, Hao1</i>
19	GO:0046395	<i>carboxylic acid catabolic process</i>	<i>Amdhd1, Fabp1, Tdo2, Hao1</i>
20	GO:0006720	<i>isoprenoid metabolic process</i>	<i>Rarres2, Hmgcs2</i>

Tabelle 49: *Gene Ontology (GO)-Analyse der herunterregulierten Gene in den Nieren behandelter AhR-Knockout-Tiere ($A \geq 7$, $\log_2 fc \leq -1$, p -Wert $\leq 0,05$); Erstellt mit topGO; Classical enrichment-Analyse zur Überprüfung der Anreicherung von GO terms innerhalb der Gruppe der unterschiedlich exprimierten Gene durch Fisher's exact Test. Anmerkung: '*' Zwei einzelne probes von diesem Gen waren hoch-reguliert*

GO.ID	GO-term	Beteiligte Gene	
1	GO:0006629	lipid metabolic process	<i>Pparg, Scd2, G6pdx, Cidea, Akr1b7, Fabp4, Fads1, Gata6, Fdxr, Fasn, Star, Hsd3b6, Crem, Adh1, Abca1, Scd1, Scarb1, Slc27a3, Cyp2e1, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Thrsp, Acaca*, Dhcr7, Ppap2a, Acly, Prkar2b, Akt2, Hsd3b1, Scd3, Igf2, Agpat2, Cyp21a1, Akr1d1, Cyp11b1, Akr1b3, Fads2*, ENSMUST00000097840</i>
2	GO:0008610	lipid biosynthetic process	<i>Scd2, G6pdx, Fads1, Fasn, Star, Hsd3b6, Scd1, Scarb1, Acsm3, Acsl4, Thrsp, Acaca*, Dhcr7, Ppap2a, Acly, Hsd3b1, Scd3, Igf2, Agpat2, Cyp21a1, Akr1d1, Cyp11b1, Fads2*, ENSMUST00000097840</i>
3	GO:0044283	small molecule biosynthetic process	<i>Scd2, G6pdx, Fads1, Gclc, Pnmt, Fasn, Star, Scd1, Asns, Acsm3, Acaca*, Acly, Pkm2, Scd3, Gch1, Agpat2, Akr1d1, Akr1b3, Th, Fads2*,</i>
4	GO:0055114	oxidation-reduction process	<i>Pparg, Akr1b8, Scd2, Necab2, G6pdx, Dmgdh, Hpd, Akr1b7, Aox1, Fads1, Cyp2f2, Fdxr, Fasn, Hsd3b6, Cox8b, Ywhag, Adh1, Scd1, Pygm, Cyp2e1, Dhcr7, Srxn1, Dhhd, Dio1, Fdx1, Akt2, Hsd3b1, Scd3, Igf2, Cyp21a1, Akr1d1, Cyp11b1, Akr1b3, Th, Fads2*,</i>
5	GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	<i>Pparg, Scd2, Fabp4, Fads1, Fasn, Star, Adh1, Scd1, Slc27a3, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Acaca*, Acly, Prkar2b, Pkm2, Akt2, Scd3, Akr1d1, Fads2*,</i>
6	GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	<i>Pparg, Scd2, G6pdx, Dmgdh, Hpd, Fabp4, Fads1, Gclc, Fasn, Star, Slc23a2, Adh1, Scd1, Slc27a3, Asns, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Acaca*, Acly, Prkar2b, Pkm2, Akt2, Scd3, Agpat2, Akr1d1, Th, Fads2*</i>
7	GO:0043436	oxoacid metabolic process	<i>Pparg, Scd2, G6pdx, Dmgdh, Hpd, Fabp4, Fads1, Gclc, Fasn, Star, Slc23a2, Adh1, Scd1, Slc27a3, Asns, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Acaca*, Acly, Prkar2b, Pkm2, Akt2, Scd3, Agpat2, Akr1d1, Th, Fads2*,</i>
8	GO:0044255	cellular lipid metabolic process	<i>Pparg, Scd2, Akr1b7, Fabp4, Fads1, Gata6, Fasn, Star, Crem, Adh1, Scd1, Slc27a3, Cyp2e1, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Thrsp, Acaca*, Ppap2a, Acly, Prkar2b, Akt2, Scd3, Agpat2, Fads2*,</i>
9	GO:0006082	organic acid metabolic process	<i>Pparg, Scd2, G6pdx, Dmgdh, Hpd, Fabp4, Fads1, Gclc, Fasn, Star, Slc23a2, Adh1, Scd1, Slc27a3, Asns, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Acaca*, Acly, Prkar2b, Pkm2, Akt2, Scd3, Agpat2, Akr1d1, Th, Fads2*,</i>
10	GO:0044281	small molecule metabolic process	<i>Pparg, Scd2, G6pdx, Tbc1d20, Abcb1b, Dmgdh, Hpd, Fabp4, Mrap, Fads1, Gclc, Tubb6, Car3, Fdxr, Pnmt, Fasn, Star, Igfbp5, Slc23a2, Atp4a, Timp2, Adh1, Abca1, Scd1, Scarb1, Slc27a3, Asns, Ampd2, Cyp2e1, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Adrb3, Thrsp, Acaca*, Dhcr7, Ppap2a, Acly, Dhhd, Prkar2b, Fdx1, Pkm2, Akt2, Wdr92, Scd3, Gch1, Igf2, Agpat2, Akr1d1, Akr1b3, Th, Fads2*,</i>
11	GO:0042180	cellular ketone metabolic process	<i>Pparg, Scd2, G6pdx, Dmgdh, Hpd, Fabp4, Fads1, Gclc, Fasn, Star, Slc23a2, Adh1, Scd1, Slc27a3, Asns, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Acaca*, Acly, Prkar2b, Pkm2, Akt2, Scd3, Agpat2, Akr1d1, Th, Fads2*,</i>
12	GO:0016053	organic acid biosynthetic process	<i>Scd2, Fads1, Gclc, Fasn, Star, Scd1, Asns, Acsm3, Acaca*, Acly, Pkm2, Scd3, Agpat2, Akr1d1, Fads2*,</i>
13	GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	<i>Scd2, Fads1, Gclc, Fasn, Star, Scd1, Asns, Acsm3, Acaca*, Acly, Pkm2, Scd3, Agpat2, Akr1d1, Fads2*,</i>

14	GO:0006631	<i>fatty acid metabolic process</i>	<i>Pparg, Scd2, Fabp4, Fads1, Fasn, Scd1, Slc27a3, Acsm3, Acsl4, Tnxb, Acaca*</i> , <i>Acly, Prkar2b, Akt2, Scd3, Fads2*</i> ,
15	GO:0008202	<i>steroid metabolic process</i>	<i>G6pdx, Fdxr, Fasn, Star, Hsd3b6, Abca1, Scd1, Scarb1, Cyp2e1, Dhcr7, Hsd3b1, Igf2, Cyp21a1, Akr1d1, Cyp11b1, Akr1b3, ENSMUST00000097840</i>
16	GO:0006639	<i>acylglycerol metabolic process</i>	<i>Fasn, Cyp2e1, Acsl4, Tnxb, Thrsp, Acaca*</i> , <i>Ppap2a, Acly, Agpat2</i> ,
17	GO:0006638	<i>neutral lipid metabolic process</i>	<i>Fasn, Cyp2e1, Acsl4, Tnxb, Thrsp, Acaca*</i> , <i>Ppap2a, Acly, Agpat2</i> ,
18	GO:0042445	<i>hormone metabolic process</i>	<i>Star, Hsd3b6, Pcsk1n, Pcsk5, Adh1, Scarb1, Cpe, Dio1, Igf2, Cyp21a1, Akr1d1, Cyp11b1, ENSMUST00000097840</i>
19	GO:0046460	<i>neutral lipid biosynthetic process</i>	<i>Fasn, Acsl4, Thrsp, Acaca*</i> , <i>Ppap2a, Acly, Agpat2</i> ,
20	GO:0046463	<i>acylglycerol biosynthetic process</i>	<i>Fasn, Acsl4, Thrsp, Acaca*</i> , <i>Ppap2a, Acly, Agpat2</i> ,

4.6.3 TCDD-behandelte AhR-Wildtyp-Mäuse

Die Behandlung von AhR-Wildtyp-Mäusen mit TCDD löste in den Nieren die Regulierung einer großen Anzahl von Genen aus. In AhR^{+/+}-Mäusen wurden 152 Gene hoch- und 20 Gene herunterreguliert. Unter den hochregulierten Genen hatten 27 % einen $\log_2 fc > 2$. Die restlichen 73% der Gene wiesen dagegen nur eine leichte aber signifikante Erhöhung der Expression auf und besaßen einen $\log_2 fc$ zwischen 1 und 2.

Wegen der großen Anzahl an Genen wird nur auf die zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene (siehe Tabelle 50) in den Nieren behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse näher eingegangen. Die komplette Liste der regulierten Gene befindet sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Tabelle 80 und 81).

Zu den am stärksten hochregulierten Genen gehörte *Cyp1a1*, das zur Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme gehört und einer der bekanntesten Marker für die Aktivierung des AhR durch Dioxine ist (Poland und Knutson 1982, Whitlock *et al.* 1996). Weitere Gene der „klassischen“ murinen AhR-Genbatterie wie *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Aldh3a1* zeigten im Microarray der Nieren weiblicher TCDD-behandelter Wildtyp-Mäuse ebenfalls eine erhöhte Expression. Die AhR-vermittelte Induktion von *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* wurde in mehreren Studien belegt (Hankinson, 1995; Nebert *et al.*, 2004, 2000). Des Weiteren konnten Tijet *et al.* (2006) im Microarray zeigen, dass im Vergleich zur Kontrolle die Expression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* in den Lebern TCDD-behandelter (1000 µg/kg KG) männlicher Wildtyp-Mäuse signifikant erhöht war. *Aldh3a1*, das zu den Aldehyddehydrogenasen gehört und in Phase I des Fremdstoffmetabolismus involviert ist, wird vorwiegend in Magen und Lunge sowie in sehr geringer Konzentration auch in Leber exprimiert. Eine TCDD-vermittelte erhöhte Expression in den Nieren von Nagern wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die Induktion von *ALDH3A1/Aldh3a1* durch TCDD konnte bisher in einigen Karzinomzelllinien, in Ratten *in vitro* und *in vivo* sowie in Mäusen *in vitro* beobachtet werden, nicht jedoch *in vivo* in Mäusen (Alnouti und Klaassen, 2008; Nebert *et al.*, 2000; Vasiliou *et al.*, 1993).

Ein weiteres hochreguliertes Gen ist *Cfd* (Komplementfaktor D/Adipsin). Der durch *Cfd* codierte Komplementfaktor D gehört zur Chemotrypsinfamilie der Serinproteasen und ist ein Bestandteil des alternativen Weges des Komplementsystems, welches eine wichtige Rolle in der humoralen Immunsuppression durch Infektionserreger spielt. Adipsin wird in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert. Es tritt aber hauptsächlich in adipösem Gewebe auf, wo es sowohl durch vollentwickelte Adipozyten also auch von Makrophagen sekretiert wird (Volanakis und Narayana, 1996; White *et al.*, 1992). Eine TCDD-vermittelte Wirkung auf die Expression von *Cfd* ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Eine signifikant erhöhte Expression im Microarray zeigte das Gen *Upk1a*. Es ist ein Mitglied der Transmembran 4-Superfamilie, die auch als Tetraspanin-Familie bezeichnet wird. Exprimiert wird dieses spezifisch im Urothel (Yu *et al.*, 1994). In einer Studie von Kong *et al.* (2010) wurde gezeigt, dass *Upk1a* ebenso als Biomarker für Speiseröhrenkrebs dienen kann

und als Tumorsuppressor die Zellproliferation, die Zellmotilität und die Tumorbildung inhibiert. Eine TCDD-induzierte erhöhte Expression von *Upk1a* in der Niere wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die Gene *Cidea* und *Ucp1* zählen sowohl zu den hochregulierten Genen in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen als auch zu den herunterregulierten Genen behandelter AhR-defizienter Mäuse. Nähere Informationen zu den Genen *Cidea* und *Ucp1* sind im vorherigen Kapitel 4.6.2 zu finden.

Ein weiteres Gen, das hochreguliert wurde, ist *Fmo3* (*Flavin containing monooxygenase 3*), das zur Enzymfamilie der Flavin-abhängigen Monooxygenasen gehört, welche die NADP-abhängige Oxidation von Pestiziden und anderen Xenobiotika katalysieren (Cashman, 2002; Hines *et al.*, 1994). Zu dieser Enzymfamilie gehört auch *Fmo5*, das auch in der Liste der hochregulierten Gene behandelter Wildtyp-Mäuse zu finden ist. Die Gene *Fmo3* und *Fmo5* zeigten nur in den behandelten Wildtyp-Mäusen eine signifikant erhöhte Expression. In den behandelten Knockout-Mäusen war nur eine leicht erhöhte *Fmo3*-Expression ($\log_2 fc = 0,3$) zu beobachten, die aufgrund des hohen *p-Values* (0,65) vernachlässigt werden kann. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass *Fmo3* und *Fmo5* AhR-abhängig reguliert werden. Ähnliches postulierten Tijet *et al.* (2006). In ihrer Studie konnten sie im Microarray zeigen, dass die Expression von *Fmo3* in den Lebern männlicher AhR-Wildtyp-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle durch Behandlung mit TCDD (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) ebenfalls erhöhte wurde. In TCDD behandelten AhR-defizienten Mäusen konnte dies jedoch nicht beobachtet werden (Tijet *et al.*, 2006).

Ein weiteres Gen, das in den Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit TCDD hochreguliert wurde, war *Ly6d*. Es codiert das Protein *Lymphocyte antigen 6 complex*, das zur Familie der Zelloberflächen-Glycoproteine zählt. Ly6-Proteine werden in Lymphozyten Gewebe auf B- und T-Lymphozyten und in der Niere exprimiert (Blake *et al.*, 1993; Gumley *et al.*, 1995).

Das Gen *Krt19* codiert Keratin 19, das zur Superfamilie der Keratine gehört. Keratine sind Intermediärfilamentproteine, die für die strukturelle Integrität der Epithelzellen verantwortlich sind (Moll *et al.* 1982). *Krt19* wies in den Nieren behandelter Wildtyp-Mäuse ebenfalls eine erhöhte Expression auf. Das durch *Sprrla* codiert das *small proline rich*-Protein 1A, welches im Microarray der Nieren behandelter Wildtyp-Mäuse hochreguliert war, gehört zu einer Klasse von Polypeptiden, die während der Differenzierung von beispielsweise menschlichen Keratinozyten stark induziert werden (Gibbs *et al.*, 1993). In einer Studie von Jin *et al.* (2004) konnte an TCDD-behandelten (4 nM) Hepa1-6 Zellen eine leicht erhöhte *Sprrla*-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Da es zu den zehn am stärksten hochregulierten Genen in den Nieren TCDD-behandelter Wildtyp-Mäuse zählt, kann vermutet werden, dass die Regulierung AhR-abhängig abläuft.

Wie am Kapitelanfang schon erwähnt wurde, kam es in AhR-Wildtyp-Mäusen durch Behandlung mit TCDD zu einer Abnahme der Expression von 20 Genen. Von diesen 20 Genen wiesen 19 einen $\log_2 fc$ zwischen 1 und 2 auf. Nur ein Gen besitzt einen $\log_2 fc > 2$.

Für eine nähere Betrachtung werden die 10 am stärksten herunterregulierten Gene in den Nieren behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse ausgewählt. Zu den am stärksten herunterregulierten Genen zählt *Wdyl*. Es codiert das Protein *WD repeat and FYVE domain containing 1*, das Proteine, die am Membrantransport und an der Zellsignalgebung mit Phosphatidylinositol-3-Phosphat-haltigen Membranen beteiligt sind, rekrutiert (Ridley *et al.*, 2001).

Ren2 codiert die Aspartatprotease Renin, die in Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet wird. Es ist monospezifisch und spaltet Angiotensinogen in die aktive Form Angiotensin II. Dieses spielt eine wichtige Rolle an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks (Danser und Deinum 2005).

Das Gen *Hdc* codiert eine Histidin-Decarboxylase, die zur Familie der Gruppe II Decarboxylasen zählt. Hdc katalysiert die Umwandlung von L-Histidin in Histamin. Histamin agiert als Neurotransmitter im ZNS, reguliert Entzündungen sowie die Ausschüttung von Magensäure und den Tonus der glatten Muskulatur (Andersson *et al.*, 1999; Lovenberg *et al.*, 1962; Nuutinen und Panula, 2011).

Rnf24 codiert ein intrinsisches Membranprotein, das eine Cys₃His₂Cys₃-Ringfingerdomäne besitzt und im Golgiapparat lokalisiert ist. Es interagiert dort mit TRPC6 (*transient receptor potential channel 6*) und beeinflusst dessen intrazelluläre Retention (Lussier *et al.*, 2008).

Cdk5rap1 (*CDK5 regulatory subunit associated protein 1*) codiert ein Regulatorprotein der Cyclin-abhängigen Kinase 5. Des Weiteren wird ihm die Funktion einer RNA-Methylthiotransferase zugeschrieben (Reiter *et al.*, 2012).

Socs2 codiert ein Mitglied der *suppressor of cytokine signaling*-Familie (SOCS). Mitglieder der SOCS-Familie sind negative Regulatoren des Zytokinrezeptorsignalweges über den JAK-STAT Signalweg (Dey *et al.*, 1998; Endo *et al.*, 1997).

Ngfr codiert den NGF-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*), der zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehört und durch Bindung von Ngf die Ceramidbildung sowie Nf-κB und c-Jun-N-terminale Kinase aktiviert (Bothwell, 1996; Casaccia-Bonofil *et al.*, 1996).

Bhmt codiert die Betain-Homocystein-S-Methyltransferase, welche die Bildung von Methionin und Dimethylglycin aus Homocystein und Betain katalysiert. *Bhmt* wird vorwiegend in den Lebern und Nieren exprimiert (Pajares und Pérez-Sala, 2006; Sunden *et al.*, 1997).

Akr1c18 codiert das Enzym 20α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (20α-HSD), das zur Aldoketo-Reduktase-Familie gehört und die Umwandlung von Progesteron in seine inaktive Form 20α-Hydroxyprogesteron katalysiert. Die Expression von 20α-HSD im Gelbkörper von Mäusen und Ratten spielt eine wichtige Rolle bei der Luteolyse (Choi *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2007; Wiest *et al.*, 1968). In einer Studie von Pelletier *et al.* konnte gezeigt werden, dass die 20α-HSD auch in der Niere exprimiert wird (Pelletier *et al.*, 2003).

Ein weiteres in den Nieren der TCDD-behandelten Wildtyp-Mäuse herunterreguliertes Gen war *Cox6a2* (*cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2*), das die Cytochrom c-Oxidase codiert. Der terminale Enzymkomplex der mitochondrialen Atmungskette katalysiert den

Elektronentransfer vom reduzierten Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff (Capaldi, 1990; Hatefi, 1985). In einer Studie von Forgacs *et al.* (2010) an weiblichen TCDD-behandelten (30 µg/kg KG) C57BL/6-Mäusen war ebenfalls die *Cox6a2*-Expression nach 8 h und 18 h vermindert. Dies deutet auf eine AhR-abhängige Regulierung von *Cox6a2* hin.

Aufgrund des großen Datenaufkommens in der Microarray-Analyse wurde auch in TCDD-behandelten weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen eine *gene set enrichment*-Analyse mit topGO durchgeführt. In den Tabellen 51 und 52 sind die 20 am häufigsten vorkommenden *GO terms* mit den dazugehörigen hoch- und herunterregulierten Genen dargestellt.

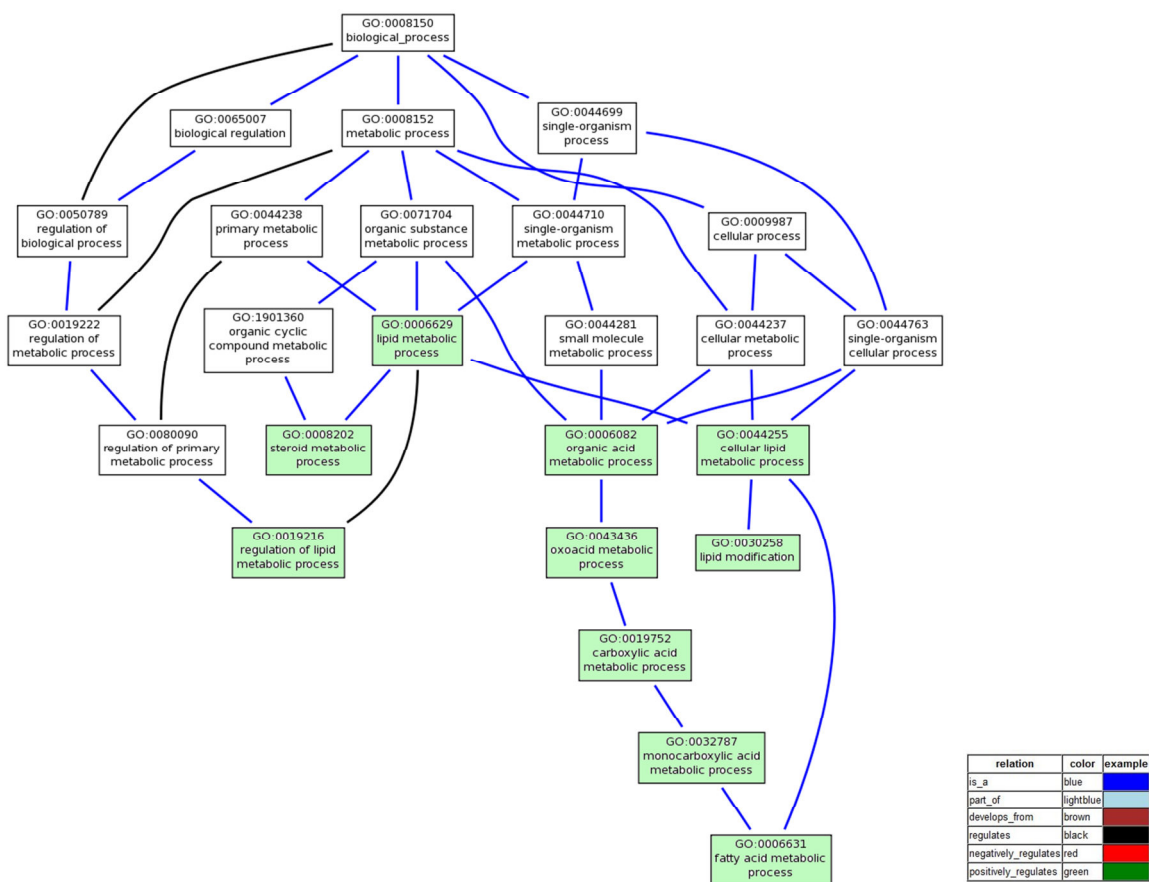


Abbildung 60: Gerichteter azyklischer *GO*-Teilgraph hochregulierter Prozesse in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse; die Daten stammen aus der topGo-Analyse der Microarray-Daten; die hochregulierten Prozesse sind gelblich hinterlegt; erstellt mit der Visualization-Software von AmiGo2

Die Behandlung der Wildtyp-Mäuse mit TCDD verursachte eine Hochregulierung des Steroid-Metabolismus (GO:0008202) der Mäuse, der sich als Verzweigung des Lipidmetabolismus (GO:0006629) darstellt. Einen Einfluss des TCDDs auf die Hochregulierung des Lipidmetabolismus (GO:0019216), die Modifikation von Lipiden

(GO:0030258) sowie auf den zellulären Lipidmetabolismus (GO:0044255) war ebenfalls zu beobachten. Des Weiteren kam es zu einer Hochregulierung des Metabolismus organischer Säuren (GO:0006082, GO:0043436, GO:0019752, GO:0032787, GO:0006631). In Abbildung 60 sind diese positiv beeinflussten Prozesse in einem gerichteten azyklischen GO-Teilgraph gezeigt.

Durch TCDD Behandlung kam es zur Hochregulierung der Differenzierung von Fettzellen (GO:0045444) insbesondere brauner Fettzellen (GO:0050873).

In Abbildung 61 ist ein gerichteter azyklischer *GO*-Teilgraph der Prozesse *brown fat cell differentiation* (GO:0050873) und *fat cell differentiation* (GO:0045444) dargestellt. Der *GO term brown fat cell differentiation* ist eine Verzweigung des *GO terms fat cell differentiation*. Beide Prozesse zählten zu den am häufigsten, vorkommenden *GO*-Kategorien in den Nieren behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse.

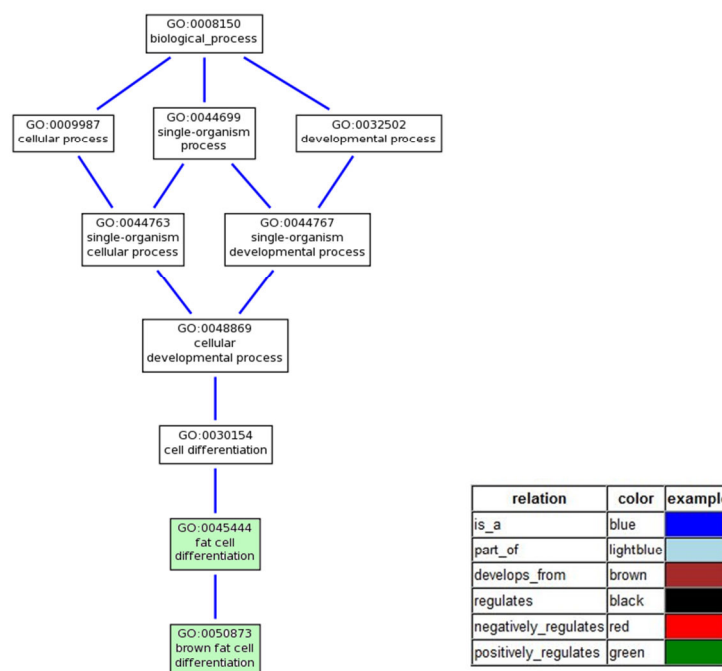


Abbildung 61: Gerichteter azyklischer *GO*-Teilgraph für die beiden *GO terms brown fat cell differentiation* (GO:0050873) und *fat cell differentiation* (GO:0045444); die Daten stammen aus der topGo-Analyse der Microarray-Daten der Nieren behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse; die hochregulierten Prozesse sind grün hinterlegt; erstellt mit der Visualization-Software von AmiGo2

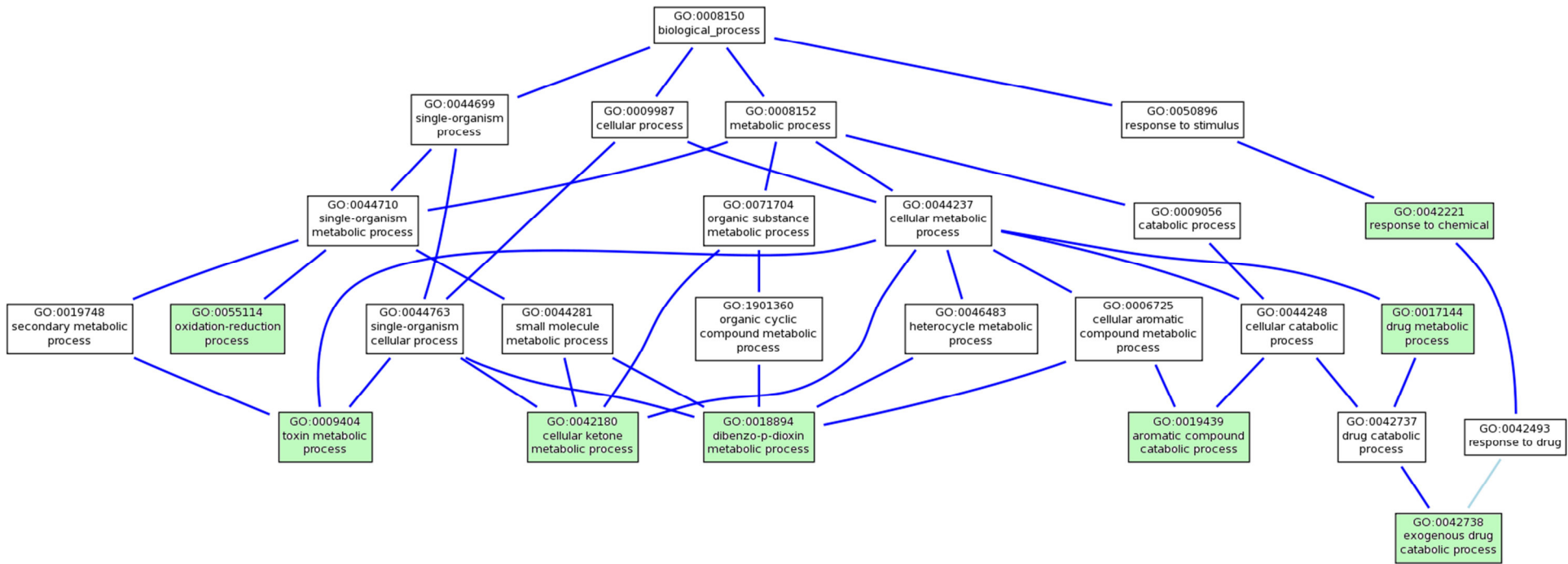
Die restlichen acht hochregulierten Prozesse können, wie in Abbildung 62 gezeigt nicht in direkte Verbindung zueinander gebracht werden. Allerdings waren in diese acht *GO terms* teilweise die gleichen Gene involviert. Unter anderem wurden *GO terms* wie *oxidation-reduction process* (GO:0055114), *cellular ketone metabolic process* (GO:0042180), *drug metabolic process* (GO:0017144), *response to chemical stimulus* (GO:0042221), *exogenous*

drug catabolic process (GO:0042738), *dibenzo-p-dioxin metabolic process* (GO:0018894), *toxin metabolic process* (GO:0009404), *aromatic compound catabolic process* (GO:0019439) durch Behandlung mit TCDD hochreguliert.

Auffallend ist, dass in fast allen Prozessen die Gene *Cyp1a1* und *Cyp1a2* involviert waren. Dies deutet darauf hin, wie auch einige *GO terms* belegen, dass der Fremdstoffmetabolismus in den Nieren von AhR-Wildtyp-Mäusen durch TCDD induziert wurde. Es konnte auch der Nachweis erbracht werden, dass der Lipidmetabolismus sowie der Metabolismus organischer Säuren durch TCDD induziert wurde.

Betrachtet man die 20 häufigsten, vorkommenden *GO terms* genauer so fällt auf, dass nur 63 der 152 (41,45 %) hochregulierten Gene in den unterschiedlichen *GO terms* zu finden sind. Von diesen 63 involvierten Genen sind lediglich vier Gene in der Liste der 10 am stärksten hochregulierten Gene vertreten. Darunter das am stärksten hochregulierte *Cyp1a1*. Dies ist auch ein Hinweis auf einen undifferenzierten TCDD-response in den Nieren von Wildtyp-Tieren und nicht nur auf die Regulierung des Fremdstoffmetabolismus sowie des Lipidmetabolismus alleine. In Tabelle 52 sind die 20 *GO terms* der herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse aufgelistet.

In AhR^{+/+}-Mäusen kam es zu einer breiten Fächerung der betroffenen Prozesse. Zum Beispiel war die Modifizierung der RNA (GO:0009451, GO:0006400) sowie die Antwort auf einen Wachstumshormonstimulus (GO:0060416, GO:0071378, GO:0060396) herunterreguliert. Des Weiteren wurden der Progesteron-Katabolismus (GO:0006709), der Histamin-Metabolismus (GO:0001692), die Antwort auf einen Estradiolstimulus (GO:0032355) sowie zwei Entwicklungsprozesse der Brustdrüsen (GO:0060749, GO:0061377) und die Laktation (GO:0007595) negativ beeinflusst. Einige Prozesse der Signaltransduktion wie der *enzym linked receptor protein signaling pathway* (GO:0007167), *negative regulation of JAK-STAT* (GO:0046426) sowie der *transmembrane receptor proteintyrosine kinase signaling pathway* (GO:007169) wurden durch Behandlung mit TCDD herunterreguliert. Die zellulären Prozesse *positive regulation of cell differentiation* (GO:0045597), *regulation of cell development* (GO:0060284) sowie *negative regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity* (GO:0045736) wurden durch die TCDD-Behandlung herunterreguliert. Auffallend ist, dass sich die *GO terms* der 20 am häufigsten vorkommenden *GO terms* nicht wie bei den hochregulierten Genen zu einem oder mehreren *GO*-Kategorien zusammenfassen lassen, sondern eher wenig bis kaum miteinander in Verbindung gebracht werden können. Auf eine Darstellung als gerichteter azyklischer *GO*-Teilgraph wurde aufgrund der geringen Übersichtlichkeit verzichtet. Dies deutet eher auf eine diffusen TCDD-response als auf die zielgerichtete Regulierung eines bestimmten Signalweges hin.



relation	color	example
is_a	blue	
part_of	lightblue	
develops_from	brown	
regulates	black	
negatively_regulates	red	
positively_regulates	green	

Abbildung 62: Gerichteter azyklischer *GO*-Teilgraph für die restlichen hochregulierten *GO terms* in den Nieren behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse; die Daten stammen aus der topGo-Analyse der Microarray-Daten; die hochregulierten Prozesse sind grün hinterlegt; erstellt mit der Visualization-Software von AmiGo2

Tabelle 50: Liste der zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$ oder ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$

Gen-Name	Gen-Beschreibung	probe Name	Systematischer Name	Log2 fc
Top 10 hoch-reguliert				
<i>Cyp1a1</i>	<i>Cytochrome P450 family 1, subunit a, polypeptide 1</i>	A_51_P279693	NM_009992	7.7
<i>Cfd</i>	<i>Complement factor D (adipsin)</i>	A_51_P156955	NM_013459	4.0
<i>Upk1a</i>	<i>Uroplakin 1A</i>	A_55_P2156425	NM_026815	3.7
<i>Cidea</i>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor</i>	A_51_P199168	NM_007702	3.7
<i>Fmo3</i>	<i>Flavin containing monooxygenase 3</i>	A_51_P269404	NM_008030	3.7
<i>Ucp1</i>	<i>Uncoupling protein 1 mitochondrial</i>	A_51_P426353	NM_009463	3.7
<i>Ly6d</i>	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>	A_51_P343517	NM_010742	3.4
<i>Fmo5</i>	<i>Flavin containing monooxygenase 5</i>	A_55_P1959595	NM_001161765	3.3
<i>Krt19</i>	<i>Keratin 19</i>	A_51_P356642	NM_008471	3.3
<i>Sprr1a</i>	<i>Small proline-rich protein 1A</i>	A_51_P139678	NM_009264	3.1
Top 10 herunter-reguliert				
<i>Wdly1</i>	<i>WD repeat and FYVE domain containing 1</i>	A_55_P2092730	NM_001111279	-2.2
<i>Ren2</i>	<i>Renin 2 tandem duplication of Ren1</i>	A_55_P1959091	NM_031193	-2.0
<i>Hdc</i>	<i>Histidine decarboxylase</i>	A_51_P254656	NM_008230	-1.9
<i>Rnf24</i>	<i>Ring finger protein 24</i>	A_51_P263302	NM_178607	-1.7
<i>Cdk5rap1</i>	<i>CDK5 regulatory subunit associated protein 1</i>	A_55_P2005005	NM_025876	-1.4
<i>Socs2</i>	<i>Suppressor of cytokine signaling 2</i>	A_55_P1992834	NM_007706	-1.4
<i>Ngfr</i>	<i>Nerve growth factor receptor</i>	A_52_P236448	NM_033217	-1.2
<i>Bhmt</i>	<i>Betaine-homocysteine methyltransferase</i>	A_55_P2105180	NM_016668	-1.1
<i>Akr1c18</i>	<i>Aldo-Keto reductase family 1, member c18</i>	A_55_P2163098	NM_134066	-1.1
<i>Cox6a2</i>	<i>Cytochrome c oxidase</i>	A_51_P509997	NM_009943	-1.1

Tabelle 51: *Gene Ontology (GO)*-Analyse der hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse ($A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$, p-Wert $\leq 0,05$); Erstellt mit topGO; *Classical enrichment*-Analyse zur Überprüfung der Anreicherung von *GO terms* innerhalb der Gruppe der unterschiedlich exprimierten Gene durch Fisher's exact Test.
Anmerkung: '*' Zwei einzelne probes dieses Gens waren hoch-reguliert

<i>GO.ID</i>	<i>term</i>	<i>Beteiligte Gene</i>
1	GO:0050873 <i>brown fat cell differentiation</i>	<i>Lamb3, Scd1, Adipoq, Pparg, Sh2b2, Fabp4, Lrg1, Mrap,</i>
2	GO:0045444 <i>fat cell differentiation</i>	<i>Retn, Lamb3, Scd1, Adipoq, Pparg, Sh2b2, Fabp4, Lrg1, Mrap, BC054059, Creb5,</i>
3	GO:0006629 <i>lipid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>ENSMUST00000097840, ENSMUST00000107229, Rbp4, Serpina6, Cidea, Fasn, Scd1, Thrsp, Adipoq, Akr1b3, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp2b10, Pon1, Pparg, Prkar2b, Fabp1, Hacl1, Angptl4, Fabp4, Acacb, Cyp2c50, Etnk2,</i>
4	GO:0055114 <i>oxidation-reduction process</i>	<i>Moscl, Fmo5, Aldh3a1, Cox8b, Cyp2b13, Fasn, Akr1b8, Fmo3, Nqo1, Scd1, Adipoq, Akr1b3, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp2b10, Cyp2b9, Cyp2d10, Pparg, Fabp1, Tdo2, Hacl1, Acacb, Cyp2c50, Cbr3,</i>
5	GO:0042180 <i>cellular ketone metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Fasn, Otc, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2b10, Pon1, Pparg, Prkar2b, Pdk4, Fabp1, Tdo2, Hacl1, Fabp4, Acacb, Slco4a1, Cbr3, Gulo,</i>
6	GO:0018894 <i>dibenzo-p-dioxin metabolic process</i>	<i>Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1,</i>
7	GO:0017144 <i>drug metabolic process</i>	<i>Fmo3, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2b10, Cyp2c50,</i>
8	GO:0044255 <i>cellular lipid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>ENSMUST00000107229, Rbp4, Fasn, Scd1, Thrsp, Adipoq, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Pon1, Pparg, Prkar2b, Fabp1, Hacl1, Fabp4, Acacb, Cyp2c50, Etnk2,</i>
9	GO:0032787 <i>monocarboxylic acid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Fasn, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Pparg, Prkar2b, Pdk4, Fabp1, Hacl1, Fabp4, Acacb,</i>
10	GO:0019752 <i>carboxylic acid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Fasn, Otc, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Pon1, Pparg, Prkar2b, Pdk4, Fabp1, Tdo2, Hacl1, Fabp4, Acacb, Slco4a1, Gulo,</i>
11	GO:0043436 <i>oxoacid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Fasn, Otc, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Pon1, Pparg, Prkar2b, Pdk4, Fabp1, Tdo2, Hacl1, Fabp4, Acacb, Slco4a1, Gulo,</i>
12	GO:0019216 <i>regulation of lipid metabolic process</i>	<i>ENSMUST00000097840, Cidea, Scd1, Thrsp, Adipoq, Cpt1b, Pparg, Fabp1, Angptl4, Acacb,</i>
13	GO:0006082 <i>organic acid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Fasn, Otc, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Cyp1a1, Cyp1a2, Pon1, Pparg, Prkar2b, Pdk4, Fabp1, Tdo2, Hacl1, Fabp4, Acacb, Slco4a1, Gulo,</i>
14	GO:0006631 <i>fatty acid metabolic process</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Fasn, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Pparg, Prkar2b, Fabp1, Hacl1, Fabp4, Acacb,</i>
15	GO:0042221 <i>response to chemical stimulus</i>	<i>Acaca*</i> , <i>Retn, ENSMUST00000097840, Hba-a2, Rbp4, Aldh3a1, Car3, Foxa1, Serpina3c, Nqo1, Adipoq, Alas2, Akr1b3, Bche, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp2b10, Fga, Kcnk3, Krt18, Pon1, Pparg, Prkar2b, Ccl9, Hp, Sh2b2, Pf4, Retn, Fabp4, Serpincl, Acacb, Cyp2c50,</i>

16	GO:0009404	<i>toxin metabolic process</i>	<i>Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1,</i>
17	GO:0019439	<i>aromatic compound catabolic process</i>	<i>Cyp1a1, Pon1, Tdo2, Ugt2b35,</i>
18	GO:0030258	<i>lipid modification</i>	<i>ENSMUST00000107229, Scd1, Adipoq, Cpt1b, Pparg, Fabp1, Hacl1, Acacb,</i>
19	GO:0042738	<i>exogenous drug catabolic process</i>	<i>Cyp1a2, Cyp2b10, Cyp2c50,</i>
20	GO:0008202	<i>steroid metabolic process</i>	<i>ENSMUST00000097840, Serpina6, Scd1, Akr1b3, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp2b10, Pon1, Cyp2c50,</i>

Tabelle 52: *Gene Ontology (GO)*-Analyse der herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse ($A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$, p-Wert $\leq 0,05$); Erstellt mit topGO; *Classical enrichment*-Analyse zur Überprüfung der Anreicherung von *GO terms* innerhalb der Gruppe der unterschiedlich exprimierten Gene durch Fisher's exact Test. Anmerkung: '*' Zwei einzelne probes dieses Gens waren herunter-reguliert

	<i>GO.ID</i>	<i>term</i>	<i>Beteiligte Gene</i>
1	GO:0060396	<i>growth hormone receptor signaling pathway</i>	<i>Socs2</i>
2	GO:0071378	<i>cellular response to growth hormone stimulus</i>	<i>Socs2</i>
3	GO:0040015	<i>negative regulation of multicellular organism growth</i>	<i>Socs2</i>
4	GO:0006400	<i>tRNA modification</i>	<i>Cdk5rap1</i>
5	GO:0060416	<i>response to growth hormone stimulus</i>	<i>Socs2</i>
6	GO:0046426	<i>negative regulation of JAK-STAT cascade</i>	<i>Socs2</i>
7	GO:0007167	<i>enzyme linked receptor protein signaling pathway</i>	<i>Itga8, Socs2, Igfbp3, Ngfr</i>
8	GO:0060749	<i>mammary gland alveolus development</i>	<i>Socs2</i>
9	GO:0061377	<i>mammary gland lobule development</i>	<i>Socs2</i>
10	GO:0045736	<i>negative regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity</i>	<i>Cdk5rap1</i>
11	GO:0007169	<i>transmembrane receptor proteintyrosine kinase signaling pathway</i>	<i>Socs2, Igfbp3, Ngfr</i>
12	GO:0007595	<i>lactation</i>	<i>Socs2</i>
13	GO:0032355	<i>response to estradiol stimulus</i>	<i>Socs2</i>
14	GO:0006709	<i>progesterone catabolic process</i>	<i>Akr1c18,</i>
15	GO:0009451	<i>RNA modification</i>	<i>Cdk5rap1</i>
16	GO:0045597	<i>positive regulation of cell differentiation</i>	<i>Socs2, Igfbp3, Ngfr</i>
17	GO:0060284	<i>regulation of cell development</i>	<i>Socs2, Igfbp3, Ngfr</i>
18	GO:0001692	<i>histamine metabolic process</i>	<i>Hdc</i>
19	GO:0052803	<i>imidazole-containing compound metabolic process</i>	<i>Hdc</i>
20	GO:0007589	<i>body fluid secretion</i>	<i>Socs2</i>

4.6.4 Vergleich der Microarray-Genexpressionsdaten

Ein Vergleich der durch den Microarray gewonnenen Genexpressionsdaten zeigt, dass von den 90 hochregulierten Genen in AhR-defizienten-Mäusen nur 13 Gene auch in AhR-Wildtyp-Mäusen durch Behandlung mit TCDD hochreguliert wurden (Abbildung 63). Von den 235 herunterregulierten Genen in AhR-defizienten Mäusen wurde keines der Gene auch in AhR-Wildtyp-Mäusen herunterreguliert.

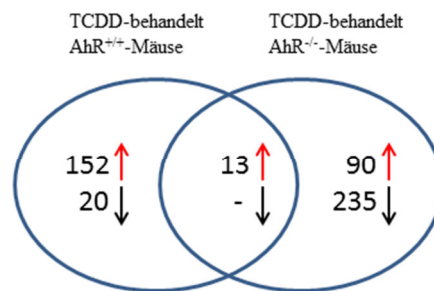


Abbildung 63: Anzahl der regulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäuse; Cut-off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$ oder ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$

Ein Vergleich der unterschiedlich regulierten Genen (Abbildung 64) in den Nieren der TCDD-behandelten AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen zeigt, dass 30 Gene, die in Wildtyp-Mäusen hochreguliert wurden, in Knockout-Mäusen herunterreguliert wurden. Dagegen wurde nur ein Gen in Knockout-Mäusen hochreguliert, das gleichzeitig in AhR-Wildtyp Mäusen herunterreguliert wurde.

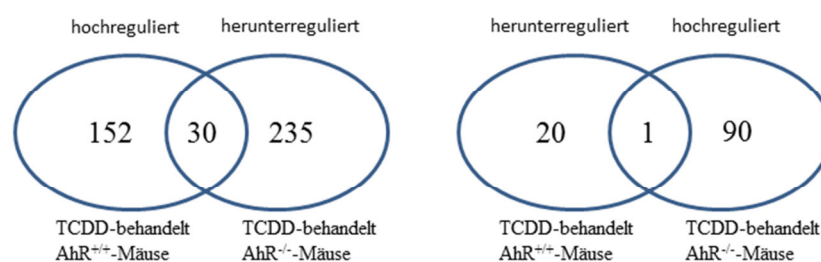


Abbildung 64: Vergleich der Anzahl der unterschiedlich regulierten Gene in den Nieren weiblicher TCDD behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse; Cut-off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$ oder ≤ -1 , p-Wert $\leq 0,05$

Im Anhang dieser sind eine Tabelle (75) mit den Genen, die in beiden Genotypen gemeinsam reguliert wurden sowie zwei Tabellen (76 und 77) mit den Genen, die in beiden Genotypen unterschiedlich reguliert wurden, zu finden.

Nachfolgend wird die Genexpression einiger ausgewählter Gene, die in der Liste der 20 am häufigsten vorkommenden *GO*-Kategorien aufgeführt sind, näher untersucht. Dabei werden die Daten TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse mit denen TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse vergleichend betrachtet.

Die Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* waren in fünf der 20 *GO*-Kategorien zu finden. Unter anderem sind sie in die Prozesse des blutbildenden Systems wie z. B. *myeloid cell differentiation* (GO:0030099), *homeostasis of number of cells* (GO:0048872), *erythrocyte homeostasis* (GO:0034101), *erythrocyte differentiation* (GO:0030218) und *erythrocyte development* (GO:0048821) involviert.

Die Gene *Hba-a1* und *Hba-a2* sowie *Hbb-b1* und *Hbb-b2* codieren die beiden α -Globin- und β -Globin-Untereinheiten des Hämoglobins. Hämoglobin ist ein eisenhaltiges Sauerstofftransportprotein, das ein wichtiger Bestandteil der roten Blutkörperchen in Wirbeltieren ist. Es besteht aus vier Globinen, den zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten (Perutz, 1960; Weed *et al.*, 1963). *Rps14* codiert das ribosomale Protein S14, das ein Bestandteil der 40S-Untereinheit der Ribosomen ist (Ebert *et al.*, 2008).

In Tabelle 53 sind die Genexpressionsdaten aus dem Microarray den Nieren für fünf Gene TCDD-behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-Knockout-Mäuse aufgeführt.

Tabelle 53: Genexpressionsdaten aus dem Microarray für die Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; Die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Hba-a1</i>	1,17	1,05
<i>Hba-a2</i>	1,05	1,27
<i>Hbb-b1</i>	0,92	1,4
<i>Hbb-b2</i>	1,03	1,38
<i>Rps14</i>	0,67	1,01

Nach der Behandlung mit TCDD stieg, wie in der Tabelle 53 zu sehen ist, die Expression aller fünf Gene in den Nieren der AhR^{-/-}-Mäuse signifikant an. Ähnliches war auch bei TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäusen zu beobachten. Hier nahm die Genexpression von *Hba-a1*, *Hba-a2* und *Hbb-b2* signifikant zu. Die Expression der Gene *Hbb-b1* und *Rps14* nahmen nur leicht zu. Da die Gene in beiden behandelten Genotypen eine leicht erhöhte Expression zeigten, kann vermutet werden, dass diese Gene AhR-unabhängig reguliert werden. Einen möglichen Mechanismus für eine TCDD-vermittelte Regulierung dieser fünf Gene ist bisher nicht bekannt.

Vier weitere Gene, die in TCDD-behandelten Knockout-Mäusen eine erhöhte Expression in den Microarray-Ergebnissen zeigten, sind die Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10*. Diese Gene sind in die Prozesse *bloodcoagulation* (GO:0007596), *hemostasis* (GO:0007599), *coagulation*

(GO:0050817), *wound healing* (GO:0042060) und *regulation of body fluid levels* (GO:0050878) involviert. Weitere Informationen zum Gen *Serpinc1* sind Kapitel 4.6.2 zu entnehmen. Das Gen *Fgg* codiert die γ -Untereinheit und *Fgb* die β -Untereinheit des Proteins Fibrinogen. Es besteht aus drei Untereinheiten, den Polypeptidketten α , β und γ , deren Expression oft gemeinsam reguliert wird. Fibrinogen und dessen γ -Kette weisen zahlreiche spezifische Bindungsstellen auf und haben Einfluss auf Zelladhäsion und -Invasion. Die β -Kette bindet ein Glykoprotein auf der Oberfläche von Endothelzellen und unterstützt so möglicherweise deren Adhäsion mit Fibrin bei der Wundheilung. Fibrinablagerungen induzieren fibrinolytische Prozesse, die durch Degradierung der extrazellulären Matrix einen Nährboden für Invasion und Metastasenbildung von Tumorzellen schaffen. In HCC-Patienten (Leberzellkarzinom) wurde im Vergleich zu gesunden Menschen eine signifikant erhöhte *Fgg*-Expression festgestellt, die mit fortschreitender Erkrankung weiter anstieg (Bloomston *et al.*, 2006; Erban und Wagner, 1992; Zhu *et al.*, 2009). In Tabelle 54 sind die Genexpressionsdaten des Microarray für diese Gene in den Nieren beider behandelten Genotypen dargestellt.

Tabelle 54: Genexpressionsdaten aus dem Microarray für die Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; Die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Serpinc1</i>	1,62	2,01
<i>Fgg</i>	1,38	1,52
<i>Fgb</i>	1,24	1,843
<i>F10</i>	0,43	1,32

Die Expression der Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* nahm sowohl in TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen als auch in TCDD-behandelten Wildtyp-Mäusen zu. In Knockout-Mäusen stärker als in Wildtyp-Mäusen. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation dieser Gene AhR-unabhängig verläuft.

Tdo2 ist ein weiteres Gen, das etwas genauer betrachtet werden soll. *Tdo2* codiert die Tryptophan-2,3-dioxygenase, die in Leber stark exprimiert wird. Ein erhöhter Level an zirkulierendem Tryptophan im Blut von *Tdo2*^{-/-}-Mäusen deutet darauf hin, dass dieses Enzym für die Tryptophan-Homöostase von Bedeutung ist. Die Tryptophan-2,3-dioxygenase katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Bildung von Kynurenin aus Tryptophan (Greengard and Feigelson, 1961; Kanai *et al.*, 2009; Schimke *et al.*, 1965). In Tabelle 55 ist die Genexpression von *Tdo2* in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse aufgeführt.

Tabelle 55: Genexpressionsdaten aus dem Microarray für das Gen *Tdo2* in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Tdo2</i>	1,03	1,14

Die Expression von *Tdo2* nimmt durch die Behandlung der Mäuse mit TCDD sowohl in AhR-defizienten Mäusen wie auch in AhR-Wildtyp-Mäusen leicht statistisch signifikant zu.

In der Literatur ist bisher eine Wirkung von TCDD auf die *Tdo2*-Genexpression nicht beschrieben. Da die Expression in beiden Genotypen durch die TCDD-Behandlung zunahm ist eine AhR-unabhängige Regulierung zu vermuten.

Unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse war das Gen *Cyp1a1* am stärksten hochreguliert. In den Nieren TCDD-behandelter AhR^{-/-}-Mäuse war dagegen keine erhöhte *Cyp1a1*-Expression zu beobachten. *Cyp1a1* gehört wie *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Aldh3a1* und *Nqo1* zur murinen AhR-Genbatterie und dient als einer der bekanntesten Biomarker für die Aktivierung des AhR durch Dioxine wie TCDD (Nebert *et al.*, 2004, 2000; Shimada *et al.*, 2002). In Tabelle 56 sind die Expressionen der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Aldh3a1*, *Nqo1* sowie *AhRR* in den Nieren TCDD-behandelter AhR^{+/+}-Mäuse und TCDD-behandelter AhR^{-/-}-Mäuse aufgelistet.

Tabelle 56: Genexpressionsdaten aus dem Microarray für die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Aldh3a1*, *Nqo1*, *Ugt2b35* sowie *AhRR* in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse und TCDD-behandelter AhR-Knockout-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Cyp1a1</i>	7,7	0,38
<i>Cyp1a2</i>	3,1	0,5
<i>Cyp1b1</i>	1,61	-0,42
<i>Aldh3a1</i>	1,03	0,13
<i>Nqo1</i>	1,3	0,8
<i>Ugt2b35</i>	1,46	-0,03
<i>AhRR</i>	1,28	0,12

Cyp1a1 ist eines der am häufigsten vorkommenden Gene in der Top 20 der *Gene Ontology*-Analyse. Das Gen *Cyp1a2* zeigte ebenfalls in den Nieren behandelter Wildtyp-Mäuse eine erhöhte Genexpression. Nebert *et al.* (2004, 2000) zeigten, dass *Cyp1a2*, welches ebenfalls zur murinen AhR-Genbatterie gehört, durch TCDD induziert wurde. *Cyp1a2* gehört, wie *Cyp1a1*, zu den Genen, die am häufigsten in der *GO*-Analyse in den *GO*-Kategorien vorkamen. Beide sind involviert in den Lipidstoffwechsel (GO:0006629, GO:0044255), den Metabolismus organischer Säuren ((GO:0006082, GO:0043436, GO:0019752, GO:0032787)

sowie den Metabolismus von Toxinen/Dioxinen und Arzneimitteln (GO:0018894, GO:0017144, GO:0009404, GO:0019439). Eine erhöhte *Cyp1b1*-Expression war ebenfalls in den Nieren behandelter Wildtyp-Mäuse zu beobachten. In behandelten AhR^{-/-}-Mäusen nahm die Expression dagegen leicht ab. In einer Studie von Boutros *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass in den Nieren von adulten Mäusen keine erhöhte Expression von *Cyp1b1* durch TCDD (1000 µg/kg KG) vorhanden war. Choi *et al.* (2006) beobachteten in den Nieren fetaler Mäuse jedoch eine Induktion der *Cyp1b1*-Expression durch TCDD (30 µg/kg KG). Eine AhR-abhängige Induktion von *Cyp1b1* konnte in einigen Studien belegt werden (Nebert *et al.*, 2004; Tijet *et al.*, 2006).

Weitere Gene, die ebenfalls zur AhR-Genbatterie gehören und in einige Prozesse der Top 20 der *GO terms* involviert sind, wie *Aldh3a1*, *Nqo1* und *Ugt2b35* wiesen in den Nieren TCDD-behandelter Wildtyp-Mäuse eine erhöhte Expression auf. In den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse war nur eine leichte Zunahme der Expression von *Nqo1* bzw. kaum eine veränderte Genexpression von *Aldh3a1* und *Ugt2b35* zu verzeichnen. In einer Studie von Alnouti *et al.* (2008) wurde in Mäusen *Aldh3a1* hauptsächlich im Magen und der Lunge exprimiert. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass durch Behandlung von Mäusen mit TCDD (34 µg/kg KG) eine schwache Induktion von *Aldh3a1* in den Lebern hervorgerufen werden konnte. Eine Induktion in den Nieren der Mäuse konnte allerdings nicht festgestellt werden (Alnouti *et al.*, 2008). In einer Studie von Anwar-Mohamed *et al.* (2012) wurde in den Nieren von männlichen C57BL/6-Mäusen nach der TCDD-Behandlung (15 µg/kg KG) eine signifikant erhöhte *Nqo1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. *Ugt2b35* wird hauptsächlich in Leber und etwas weniger im Magen, Darm und Niere exprimiert (Buckley and Klaassen, 2007) Außerdem konnten Buckley *et al.* (2009) in TCDD-behandelten (34 µg/kg KG) männlichen C57BL/6-Mäusen eine signifikante Induktion des Gens *Ugt2b35* in den Lebern und eine leichte Induktion im Darm beobachten, allerdings nicht in den Nieren. Ein weiterer Biomarker für die AhR-Aktivierung durch Dioxin ist das Gen *AhRR* (Lohr, 2013). Wie in Tabelle 56 zu sehen kam es in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer leichten aber signifikanten Zunahme der Genexpression von *AhRR*. In behandelten AhR-defizienten-Mäusen war dies nicht der Fall.

4.7 Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

4.7.1 Expression des *AhR* in Leber, Niere, Lunge und Milz

Der Western Blot des Ah-Rezeptors (AhR) in den Mäuselebern zeigte, dass auch in AhR-defizienten-Mäusen ein AhR-Protein gebildet wurde. Um die Ergebnisse des AhR-Western Blots zu verifizieren, sollte mittels Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) auf mRNA-Ebene das Vorkommen von AhR-mRNA überprüft werden. Zu Vergleichszwecken sollte der Gehalt an AhR-mRNA in den verschiedenen Organen bestimmt werden. Hierfür wurde mRNA aus Gewebeproben der unterschiedlichen Organe isoliert (siehe Kapitel 3.5.4). Die isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und für die RT-PCR verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden die RT-PCR-Messungen in den weiblichen AhR^{+/+}-Mäusen in beiden Behandlungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von vier, in den männlichen AhR^{+/+}-Mäusen in beiden Behandlungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von drei und in den männlichen AhR^{-/-}-Mäusen in beiden Behandlungsgruppen mit einem Stichprobenumfang von zwei durchgeführt. Aus diesem Grund sind in sämtlichen Abbildungen die Ergebnisse der männlichen AhR^{-/-}-Mäuse als Mittelwerte mit Spannweiten ohne Statistik und die restlichen Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

4.7.1.1 Leber

Abbildung 65 zeigt im Vergleich die Expression des *AhR* in den Lebern **weiblicher** und **männlicher** Mäuse. Durch Behandlung mit TCDD stieg sowohl in weiblichen wie auch in männlichen AhR-Wildtyp-Tieren die Expression des *AhR* leicht an, in den Weibchen signifikant. Die Expression in behandelten weiblichen Mäusen war im Vergleich etwas höher als in männlichen Mäusen.

In weiblichen AhR^{-/-}-Mäusen kam es durch Behandlung mit TCDD zu einer Abnahme der Expression, in männlichen Tieren dagegen zu einer leichten Zunahme. Ein Vergleich der Expression des *AhR* zwischen den weiblichen TCDD-behandelten Genotypen lässt erkennen, dass die Expression in AhR-Wildtyp-Mäusen gegenüber AhR-defizienten-Mäusen hochsignifikant erhöht war.

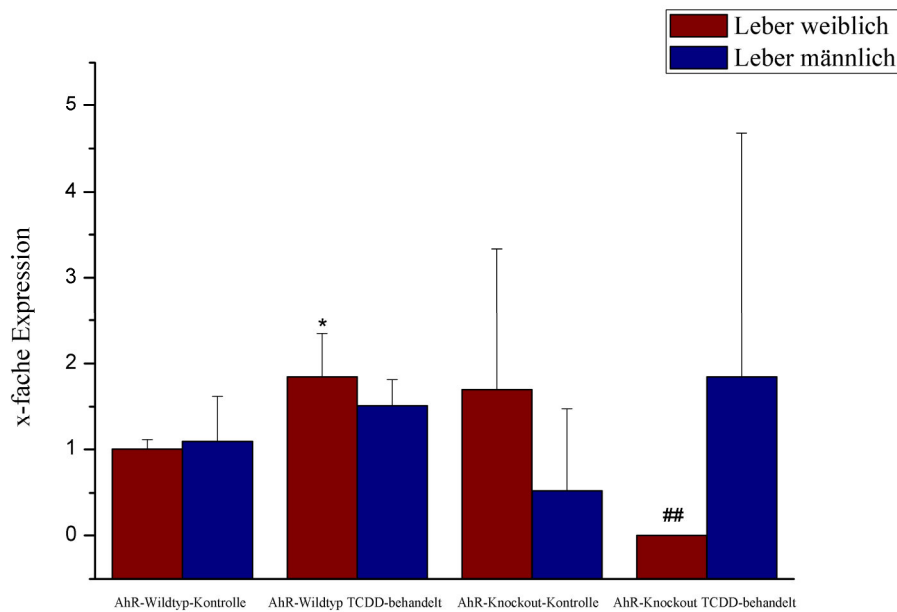


Abbildung 65: Genexpression (RT-PCR) des *AhR* in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

Die Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse des Western Blots zum AhR. Es lässt sich daraus schließen, dass auch in AhR-defizienten-Mäusen AhR-mRNA gebildet bzw. vorhanden war. Ein Vergleich der PCR-Daten mit den Daten des Microarrays lässt erkennen, dass diese ähnlich sind. In Tabelle 57 sind die Ergebnisse des Microarrays für das *AhR*-Gen in den Lebern weiblicher Mäuse aufgeführt (Lohr, 2013).

Tabelle 57: Microarray-Daten für das *AhR*-Gen in den Lebern weiblicher behandelte *AhR*^{+/+}- und *AhR*^{-/-}-Mäuse (Lohr, 2013); die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt <i>AhR</i> ^{+/+}	TCDD-behandelt <i>AhR</i> ^{-/-}
<i>AhR</i>	0,039	-0,256

Die Microarray-Daten zeigen, dass die Genexpression des *AhR*, nach der Gabe von TCDD, in AhR-Wildtyp-Mäusen kaum verändert war, während sie in AhR-defizienten-Mäusen leicht abnahm (Lohr, 2013). Dies bestätigen die Ergebnisse der RT-PCR. Pierre *et al.* (2014) konnten zeigen, dass die *AhR*-Expression in Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit TCDD (25 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ pro Woche) nach sechs Wochen leicht, aber nicht signifikant erhöht war.

4.7.1.2 Niere

Abbildung 66 zeigt die *AhR*-Expression in den Nieren von weiblichen und männlichen *AhR*-Wildtyp- und *AhR*-defizienten-Mäusen. Durch Behandlung der Mäuse mit TCDD kam es sowohl in männlichen wie auch in weiblichen *AhR*-Wildtyp-Tieren zu einer leichten, aber nicht signifikanten Zunahme der *AhR*-Expression.

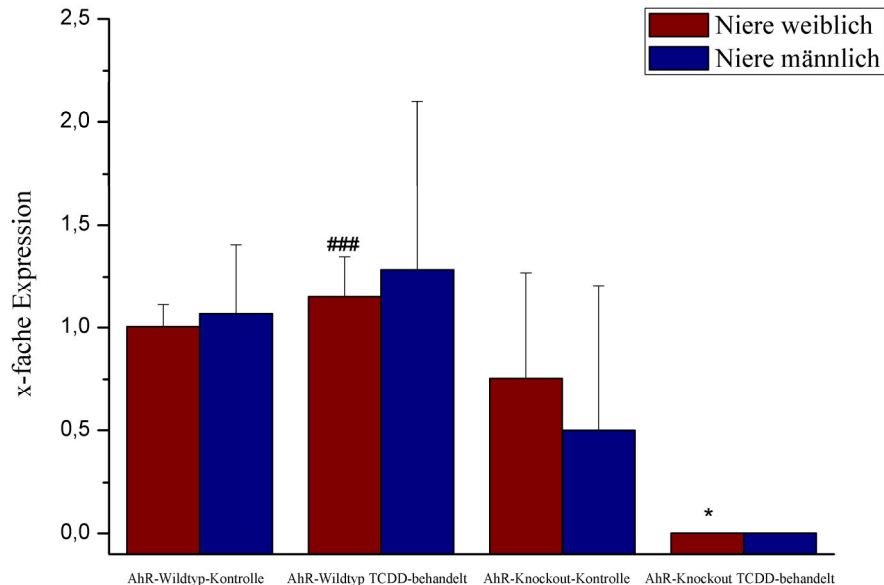


Abbildung 66: Genexpression (RT-PCR) des *AhR* in den Nieren weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche *AhR*-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche *AhR*-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche *AhR*-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ### = $p \leq 0,001$ (*AhR*-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. *AhR*-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

In weiblichen wie auch in männlichen *AhR*^{-/-}-Tieren war nach Gabe von TCDD eine Abnahme der *AhR*-Expression zu beobachten. Eine signifikante Abnahme war in den Weibchen vorhanden. Ein Vergleich der weiblichen behandelten Genotypen zeigte, dass die Expression in behandelten Wildtyp-Mäusen extrem signifikant höher war als in behandelten Knockout-Mäusen.

Als Fazit ist festzustellen, dass die Expression des *AhR* durch Behandlung mit TCDD in *AhR*-Wildtyp-Mäusen zu und in *AhR*-Knockout-Mäusen abnahm. Dies war sowohl in weiblichen wie auch männlichen Tieren zu beobachten. In Tabelle 58 sind die Ergebnisse des Microarrays für das *AhR*-Gen in den Nieren weiblicher Mäuse aufgeführt.

Tabelle 58: Microarray-Daten für das *AhR*-Gen in den Nieren behandelter weiblicher *AhR*^{+/+}- und *AhR*^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als *log2 fc*

Gen	TCDD-behandelt <i>AhR</i> ^{+/+}	TCDD-behandelt <i>AhR</i> ^{-/-}
<i>AhR</i>	-0,039	0,323

Ein Vergleich der RT-PCR Ergebnisse mit denen des Microarrays lässt erkennen, dass diese etwas unterschiedlich sind. Die Microarray Daten zeigen, dass sich die Genexpression des *AhR* in *AhR*-Wildtyp-Tieren durch TCDD-Behandlung kaum veränderte bzw. leicht abnahm, während sie in *AhR*-Knockout-Mäusen leicht zunahm. In der RT-PCR war dies umgekehrt. Die Expression nahm sowohl in den Nieren weiblicher wie auch männlicher behandelter Wildtyp-Mäuse leicht zu, während sie in den Nieren behandelter *AhR*-Knockout-Mäuse beider Geschlechter abnahm. Bei Weibchen war diese Anahme statistisch signifikant.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass sowohl in *AhR*-Wildtyp-Tieren wie auch in *AhR*-defizienten-Tieren *AhR*-mRNA vorhanden war und dass die *AhR*-Expression in weiblichen und männlichen *AhR*^{-/-}-Mäusen durch TCDD-Behandlung abnahm.

4.7.1.3 Lunge

In Abbildung 67 sind die RT-PCR Ergebnisse des *AhR* in den Lungen von **weiblichen** und **männlichen** *AhR*-Wildtyp- und *AhR*-defizienten-Mäusen dargestellt. Durch Behandlung mit TCDD war die Expression sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Wildtyp-Tieren geringer im Vergleich zur *AhR*-Wildtyp-Kontrolle. Dies war auch in weiblichen und männlichen *AhR*-defizienten-Mäusen zu beobachten. In weiblichen Mäusen war nach Gabe von TCDD eine signifikante Abnahme der *AhR*-Expression zu verzeichnen. Ein Vergleich der Genotypen zeigte in Weibchen einen hochsignifikanten Unterschied in der *AhR*-Expression. Die *AhR*-Expression TCDD-behandelter *AhR*-Wildtyp-Mäuse war hochsignifikant größer als diejenige TCDD-behandelter *AhR*-defizienter-Mäuse.

Die Ergebnisse der RT-PCR deuten darauf hin, dass sowohl in *AhR*-Wildtyp-Tieren wie auch in *AhR*-defizienten-Tieren *AhR*-mRNA vorhanden war und dass es durch Behandlung mit TCDD zu einer Abnahme der *AhR*-Expression kam. Dies war sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Mäusen zu beobachten.

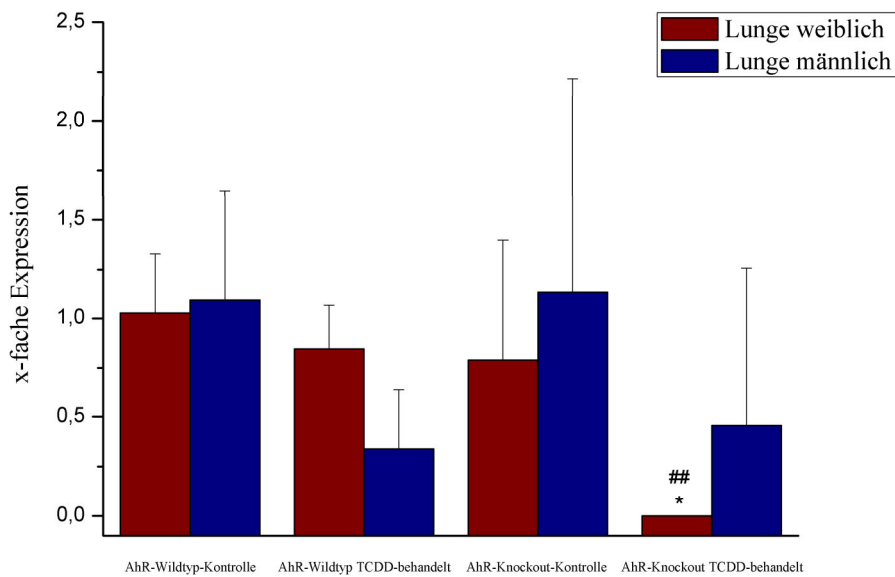


Abbildung 67: Genexpression (RT-PCR) des *AhR* in den Lungen weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

4.7.1.4 Milz

In Abbildung 68 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Genexpression in den Milzen der weiblichen und männlichen Mäuse dargestellt. Wegen unerwarteter Schwierigkeiten bei der Isolierung der mRNA konnte die Genexpressionsanalyse mit RT-PCR für die männlichen TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäuse nur mit einem Stichprobenumfang von eins durchgeführt werden. In weiblichen AhR^{+/+}-Mäusen kam es durch Behandlung mit TCDD zu einer signifikanten Zunahme der *AhR*-Expression. In männlichen Tieren war dagegen eine leichte Abnahme zu verzeichnen. Die beobachtete Veränderung der Genexpression in männlichen AhR^{+/+}-Mäusen durch die TCDD-Behandlung ist nur als Tendenz anzusehen, da die Expression nur in einer männlichen Maus gemessen werden konnte. In weiblichen AhR^{-/-}-Mäusen verminderte TCDD signifikant die Expression des *AhR*. In männlichen AhR^{-/-}-Mäusen stieg die Expression dagegen leicht an. Aufgrund der großen Spannweite in männlichen TCDD-behandelten AhR^{-/-}-Mäusen ist jedoch keine Aussage möglich, inwieweit sich die Expression veränderte. Ein Vergleich der weiblichen Genotypen zeigte einen hochsignifikanten Unterschied. Die *AhR*-Expression in den Milzen behandelter AhR^{+/+}-Mäusen war im Gegensatz zu behandelten AhR^{-/-}-Mäusen hochsignifikant erhöht.

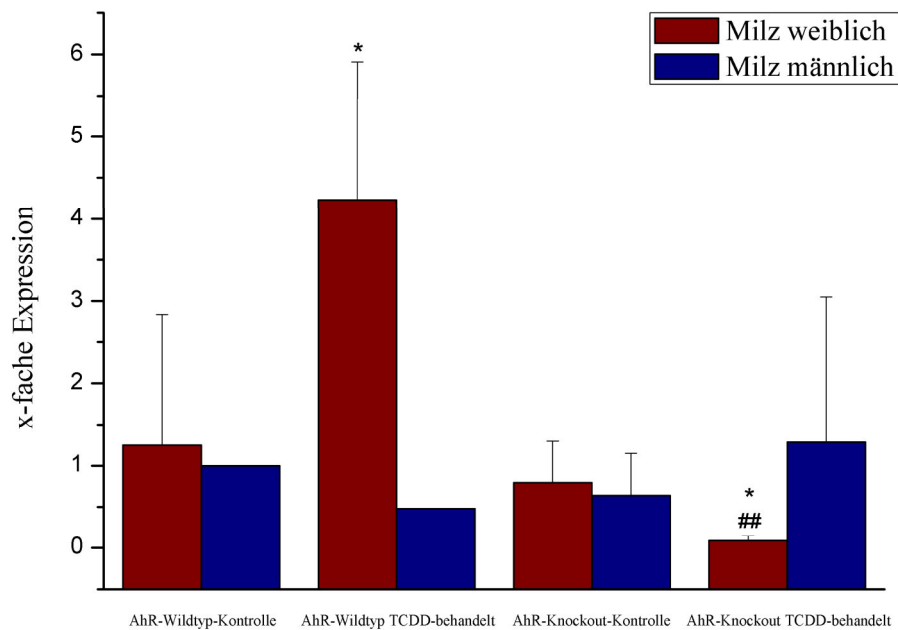


Abbildung 68: Genexpression (RT-PCR) des *AhR* in den Milzen weiblicher und männlicher Mäuse; $1 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD-behandelt weiblich vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt weiblich)

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass sowohl in $AhR^{+/+}$ -Tieren als auch in $AhR^{-/-}$ -Tieren *AhR*-mRNA in den Milzen vorhanden war und dass durch TCDD-Behandlung die Expression des *AhR* in weiblichen $AhR^{+/+}$ -Mäusen signifikant anstieg während sie in weiblichen $AhR^{-/-}$ -Mäusen signifikant abnahm.

4.7.2 Expression der Cytochrom P450-Enzyme in Leber, Niere, Lunge und Milz

Die Genexpression einiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme wies im Microarray eine TCDD-vermittelte Induktion in Leber und Niere von weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen auf. Western Blot und EROD-Assay zeigten auf Proteinebene nicht nur in Leber und Niere sondern auch in Lunge und Milz den Einfluss von TCDD auf die Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1. Im Folgenden sollte der Effekt von TCDD auf die mRNA-Expression der AhR-Zielgene *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* sowie des CAR-regulierten Gens *Cyp2b10* und des PXR-regulierten Gens *Cyp3a44* mit Hilfe von RT-PCR in Leber, Niere, Lunge und Milz von männlichen und weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen überprüft und bestätigt werden. Des Weiteren sollte die Auswirkung einer TCDD-Behandlung auf die Expression dieser Gene in AhR-defizienten-Mäusen untersucht werden.

4.7.2.1 Leber

In Abbildung **69A** ist die Genexpression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* sowie *Cyp3a44* in den Lebern **weiblicher** Mäuse gezeigt. Die Daten für die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* sind der Dissertation von Frau Dr. Lohr (Lohr, 2013) entnommen. Durch Behandlung der Mäuse mit TCDD kam es zu einer hochsignifikanten Induktion der Gene *Cyp1a1* (auf 5347 ± 1079 -fach), *Cyp1a2* (auf 67 ± 28 -fach), *Cyp1b1* (auf 716 ± 290 -fach) und *Cyp2b10* (auf $2,09 \pm 0,30$ -fach) in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen. Die *Cyp3a44*-Expression nahm in TCDD-behandelten Wildtyp-Mäusen statistisch hochsignifikant ab. In AhR-defizienten-Mäusen wurde durch TCDD-Behandlung eine statistisch hochsignifikante Abnahme der *Cyp1a1*- und *Cyp3a44*-Expression ausgelöst. Die *Cyp1a2*-Expression nahm ebenfalls leicht ab, während sich die Expression von *Cyp2b10* kaum veränderte. Dahingegen nahm die *Cyp1b1*-Genexpression signifikant auf $2,14 \pm 0,81$ -fach zu. Ein Vergleich der Genotypen zeigt einen statistisch hochsignifikanten Unterschied der Genexpression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* und *Cyp2b10* zwischen behandelten AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäusen.

In Abbildung **69B** ist die Genexpression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* sowie *Cyp2b10* in den Lebern **männlicher** Mäuse dargestellt. Das Gen *Cyp3a44* wurde nur in weiblichen Mäusen gemessen, da es ausschließlich in diesen exprimiert wird (Sakuma *et al.*, 2002). Durch Behandlung von Mäusen mit TCDD kam es in den AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Expression der Gene *Cyp1a1* (auf 4313 ± 1413 -fach), *Cyp1a2* (auf 35 ± 15 -fach) sowie *Cyp2b10* (auf $3,13 \pm 0,55$ -fach). TCDD induzierte in männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen extrem signifikant *Cyp1b1* (auf 431 ± 30 -fach). In TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen war dagegen nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der *Cyp1a1*-, *Cyp1a2*-, *Cyp1b1*- und *Cyp2b10*-Expression zu beobachten.

In Tabelle **59** ist das Ergebnis des Microarrays für die *Cyp1b1*-Expression in den weiblichen Mäusen dokumentiert (Lohr, 2013).

Tabelle 59: Microarray-Daten des Gens *Cyp1b1* in den Lebern behandelter weiblicher AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse (Lohr, 2013); die Werte sind angegeben als *log₂ fc*

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Cyp1b1</i>	6,00	1,51

Die Microarray-Ergebnisse zeigen ebenfalls wie die Ergebnisse der RT-PCR weiblicher Mäuse, dass die *Cyp1b1*-Expression durch TCDD sowohl in AhR-Wildtyp- wie auch in AhR-defizienten-Mäusen induziert wurde. Dies deutet auf eine mögliche AhR-unabhängige Regulierung von *Cyp1b1* hin. Der Östrogenrezeptor (ER α) scheint bei der Transkription von *Cyp1b1* eine wichtige Rolle zu spielen, da an transfizierten NHBE-Zellen (humane

Bronchialepithelzellen) gezeigt werden konnte, dass $ER\alpha$ die basale Expression von *Cyp1b1* erhöhte (Han *et al.*, 2005).

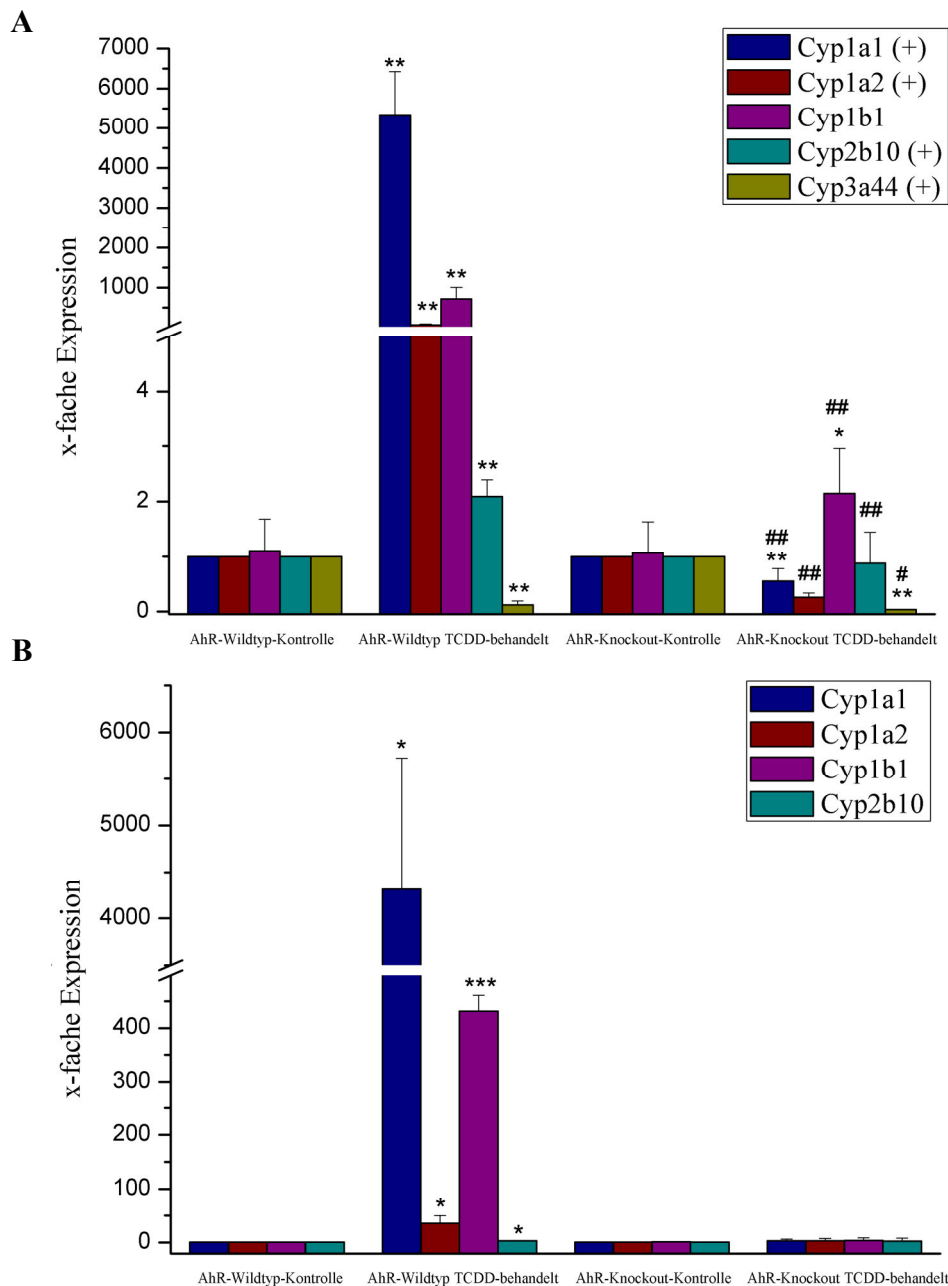


Abbildung 69: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; (+) = Daten für die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* stammen aus der Dissertation von Frau Dr. Lohr (Lohr, 2013); Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,005$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelte); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* und *Cyp2b10* in den Lebern weiblicher wie auch männlicher TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse zunahm. Bei TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen kam es in den Männchen zu einer leichten, aber nicht signifikanten Zunahme der Expression dieser Gene. In den Weibchen dagegen nahm die Expression der Gene bis auf die Expression von *Cyp1b1* ab. Diese nahm signifikant zu. Bui *et al.* (2012) konnte eine hochsignifikante Zunahme der Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1a2* sowie eine signifikante Zunahme von *Cyp1b1* in den Lebern von TCDD-behandelten (50 µg/kg KG) AhR-Wildtyp-Mäusen beobachten, bei AhR-defizienten-Mäusen war keine erhöhte *Cyp1b1*-Expression festzustellen. *Cyp2b10* ist ein über CAR reguliertes Gen und wies in weiblichen und männlichen TCDD-behandelten Wildtyp-Mäusen in den Lebern eine erhöhte Expression auf. Da *Cyp2b10* in AhR-defizienten-Mäusen aber keine Induktion durch TCDD aufwies, deutet dies möglicherweise auf eine Ahr-abhängige Regulierung hin. In verschiedenen Studien wurde berichtet, dass TCDD die Expression von *Cyp2b10* leicht, aber nicht signifikant erhöhte (Kopec *et al.*, 2010; Petrick und Klaassen, 2007). Petrick und Klaassen (2007) konnten an männlichen C57BL/6-Mäusen zeigen, dass TCDD (37 µg/kg KG) in den Lebern, AhR-vermittelt, die CAR-Expression signifikant induzierte und dadurch auch die *Cyp2b10*-Expression leicht erhöhte (Petrick and Klaassen, 2007). Dies könnte eine Erklärung für die beobachtete, TCDD-vermittelte, erhöhte *Cyp2b10*-Expression in den Lebern weiblicher und männlicher AhR-Wildtyp-Mäuse sein.

Die Ergebnisse der RT-PCR zu den Genen *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* bestätigen die Ergebnisse der Western Blots sowie des EROD-Assays. Durch Behandlung mit TCDD kam es in AhR-Wildtyp-Tieren zu einer Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene.

4.7.2.2 Niere

In Abbildung 70A sind die Expressionsergebnisse der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* sowie *Cyp2b10* und *Cyp3a44* in den Nieren weiblicher Mäuse dargestellt. Durch Gabe von TCDD kam es in AhR-Wildtyp-Tieren zu einer signifikanten Zunahme der *Cyp1a1*- (auf 2415 ± 1094 -fach), *Cyp1a2*- (auf $11 \pm 4,58$ -fach), *Cyp1b1*- (auf $3,68 \pm 1,55$ -fach), *Cyp2b10*- (auf $8,51 \pm 4,23$ -fach) und *Cyp3a44*-Expression (auf $7,81 \pm 4,81$ -fach). Amara *et al.* (2012) kamen in einer Studie an männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen zu ähnlichen Ergebnissen. Eine signifikante Zunahme der Expression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* konnte in den Nieren nach Behandlung der Mäuse mit TCDD (15 µg/kg KG) beobachtet werden (Amara *et al.*, 2012). Die beobachtete signifikante Zunahme der *Cyp2b10*-Expression ist wie in den Lebern möglicherweise auf eine Induktion von CAR zurückzuführen. In einer Studie von Petrick *et al.* (2007) konnte an weiblichen und männlichen C57BL/6-Mäusen gezeigt werden, dass

TCDD (37 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) CAR induzierte. Dies verursachte einen leichten Anstieg der *Cyp2b10*-Expression (Petrick and Klaassen, 2007).

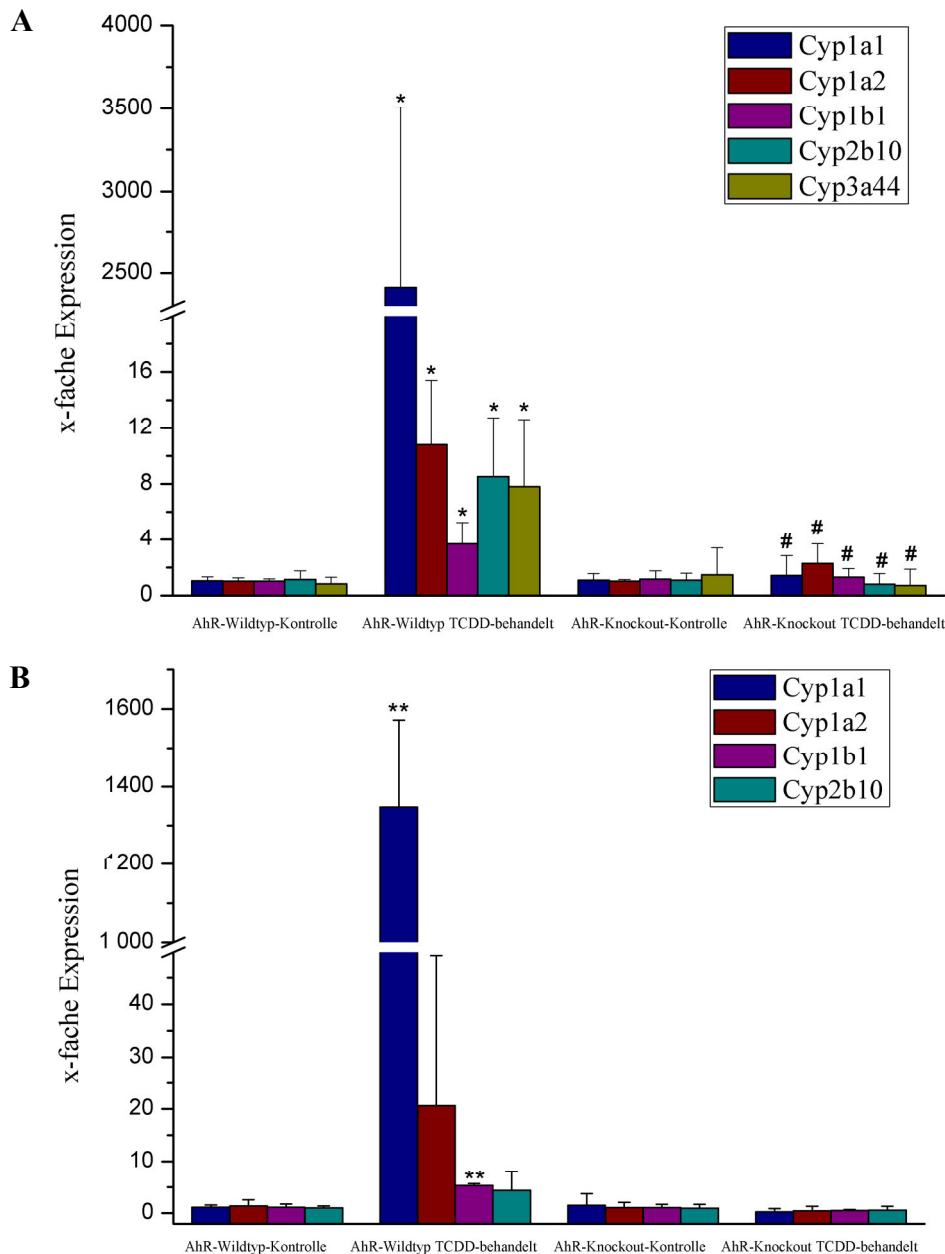


Abbildung 70: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

In AhR-Knockout-Mäusen veränderte sich die Expression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* durch Applikation von TCDD kaum. Ein Vergleich zwischen den Genotypen zeigte, dass die Expression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44*

in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen signifikant höher war als in behandelten AhR-Knockout-Mäusen.

In Abbildung **70B** ist die Expression der Cytochrom P450-Enzyme in den Nieren **männlicher** Mäuse dargestellt. Eine erhöhte Expression der Gene *Cyp1a1* (auf 1347 ± 225 -fach), *Cyp1a2* (auf 21 ± 29 -fach), *Cyp1b1* (auf $5,29 \pm 0,37$ -fach) und *Cyp2b10* (auf $4,34 \pm 3,71$ -fach) war nur in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Die Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* nahm durch die Behandlung mit TCDD statistisch hochsignifikant zu. In AhR-defizienten-Mäusen führte die TCDD-Behandlung zu keiner Induktion dieser Gene.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl in männlichen wie auch in weiblichen TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* sowie in weiblichen Tieren *Cyp3a44* induziert wurden. In behandelten AhR-defizienten Mäusen war dies nicht der Fall. Die Genexpression von *Cyp1a1* und *Cyp2b10* nahm in weiblichen behandelten Wildtyp-Mäusen stärker zu als in Männchen. Die Genexpression von *Cyp1a2* und *Cyp1b1* waren dagegen in männlichen behandelten Tieren etwas höher als in Weibchen.

In Tabelle **60** sind die Ergebnisse des Microarrays für die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* sowie *Cyp3a44* für die Nieren weiblicher Mäuse aufgeführt. Vergleicht man die RT-PCR Ergebnisse weiblicher Mäuse mit denen des Microarrays, so sind ähnliche Ergebnisse zu beobachten.

Tabelle 60: Microarray-Daten der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* in den Nieren behandelter weiblicher AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Cyp1a1</i>	7,66	0,38
<i>Cyp1a2</i>	3,11	0,5
<i>Cyp1b1</i>	1,61	-0,42
<i>Cyp2b10</i>	1,65	-0,14
<i>Cyp3a44</i>	0,82	-0,17

Wie in Tabelle **60** zu sehen, nahm die Expression der fünf Gene in behandelten Wildtyp-Tieren zu. In behandelten Knockout-Mäusen nimmt die Genexpression von *Cyp1b1*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* leicht ab während die von *Cyp1a1* und *Cyp1a2* leicht zunahm.

Das Resultat der RT-PCR für die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* untermauert die Ergebnisse der Western Blots und des EROD-Assays. Sowohl auf mRNA-Ebene wie auf Proteinebene war durch Applikation von TCDD in AhR-Wildtyp-Tieren eine Induktion von *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* zu beobachten.

4.7.2.3 Lunge

In Abbildung 71A sind die RT-PCR Ergebnisse der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* sowie *Cyp3a44* für die Lungen **weiblicher** Mäuse dargestellt. Durch Behandlung mit TCDD kam es in AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer hochsignifikanten Zunahme der Expression von *Cyp1a1* (2612 ± 91 -fach) und *Cyp1b1* ($39 \pm 8,29$ -fach). In behandelten AhR-Knockout-Mäusen nahm die Expression der beiden Gene leicht ab. Ein Vergleich zwischen den behandelten Genotypen zeigte, dass die Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* hochsignifikant höher war im AhR-Wildtyp wie im AhR-Knockout. Die Genexpression von *Cyp1a2* und *Cyp2b10* in AhR-Wildtyp-Mäusen veränderte sich kaum durch TCDD-Behandlung. Dies war auch in AhR-defizienten-Mäusen zu beobachten. Die Expression von *Cyp3a44* veränderte sich durch Applikation von TCDD sowohl in AhR-Wildtyp- als auch in AhR-Knockout-Mäusen kaum.

Ähnliches konnten Bui *et al.* (2012) in einer Studie an Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäusen nach TCDD-Behandlung (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) belegen. Eine signifikante Zunahme der Genexpression von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* konnte in den Lungen TCDD-behandelter Wildtyp-Mäuse beobachtet werden, während sich die Expression von *Cyp1a2* kaum veränderte. Eine TCDD-vermittelte Induktion dieser drei Gene konnte in TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen in dieser Studie nicht nachgewiesen werden (Bui *et al.*, 2012).

Abbildung 71B zeigt die Genexpression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* in den Lungen **männlicher** Mäuse. In männlichen Mäusen war eine Induktion der Gene *Cyp1a1* (203 ± 35 -fach), *Cyp1a2* ($8,28 \pm 7,61$ -fach) und *Cyp1b1* ($33 \pm 4,12$ -fach) nur in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen zu verzeichnen. Der Anstieg der Expression der Gene *Cyp1a1* und *Cyp1b1* war hochsignifikant. Die *Cyp2b10*-Genexpression veränderte sich kaum. In AhR-defizienten-Mäusen veränderte sich durch TCDD-Behandlung die Expression aller vier Gene ebenfalls nur geringfügig. Ein Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zeigt, dass in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen die Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* in beiden Geschlechtern hochsignifikant zunahm, wobei in weiblichen Mäusen die Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* etwas höher ausfiel. Die Expression von *Cyp1a2*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* in behandelten AhR-Wildtyp-Weibchen veränderte sich kaum. Ähnliches galt auch für das Gen *Cyp2b10* in behandelten Männchen. Dagegen wurde *Cyp1a2* durch TCDD in männlichen Wildtyp-Mäusen leicht, aber nicht signifikant induziert.

Die RT-PCR Ergebnisse zeigten ähnliche und in die gleiche Richtung regulierte Trends wie die der Western Blots und des EROD-Assays. Durch Gabe von TCDD kam es in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen zu einer Induktion von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* auf mRNA- und Proteinebene. Die Western Blots belegten eine Induktion von *Cyp1a2* auf Proteinebene. Eine Induktion auf mRNA-Ebene war nicht zu beobachten. In männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen war eine Induktion von *Cyp1a1* und *Cyp1a2* auf mRNA- und Proteinebene nach Gabe von

TCDD zu beobachten. Eine Induktion von *Cyp1b1* war nur auf mRNA-Ebene zu erkennen. Auf Proteinebene war in den Western Blots keine Induktion zu verzeichnen.

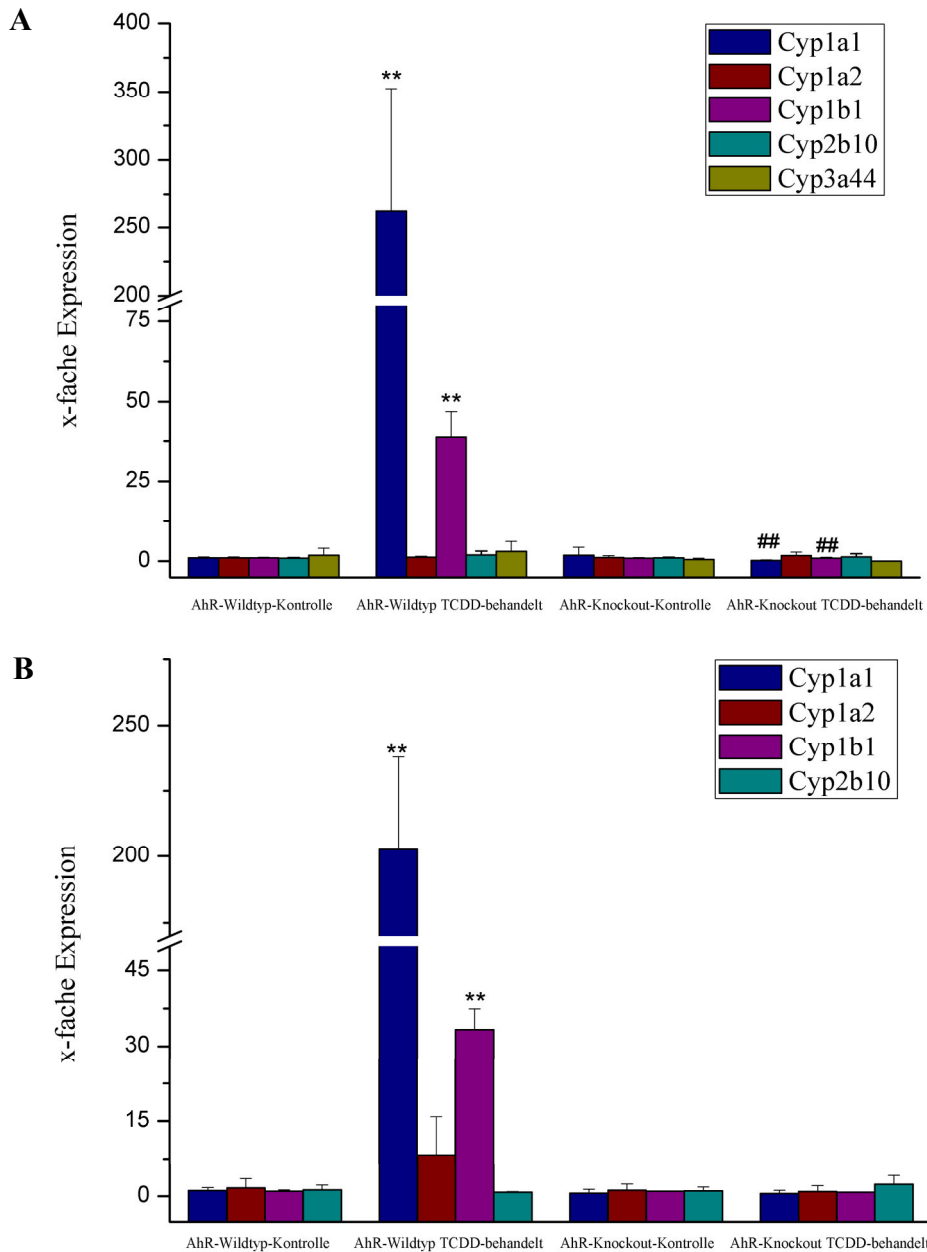


Abbildung 71: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Lungen A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

4.7.2.4 Milz

In Abbildung 72 ist die Genexpression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* in den Milzen weiblicher Mäuse dargestellt. Durch Behandlung weiblicher AhR-Wildtyp-Tiere mit TCDD kam es zu einer leichten Abnahme der Expression der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* und *Cyp2b10*, während sich die Expression von *Cyp3a44* kaum veränderte.

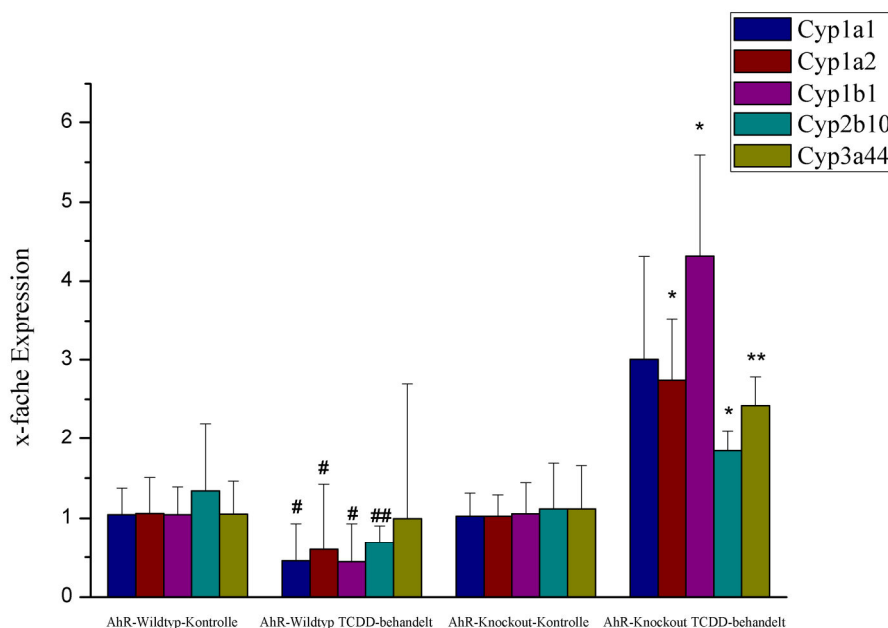


Abbildung 72: Genexpression (RT-PCR) der Cytochrom P450-Enzyme in den Milzen weiblicher Mäuse; $3 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

Im Gegensatz dazu führte die Applikation von TCDD in weiblichen AhR-defizienten-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression von *Cyp1a2* ($2,74 \pm 0,79$ -fach), *Cyp1b1* ($4,31 \pm 1,29$ -fach) und *Cyp2b10* ($1,85 \pm 0,26$ -fach). Die Expression von *Cyp3a44* ($2,42 \pm 0,36$ -fach) nahm hochsignifikant zu. Die Expression von *Cyp1a1* nahm dagegen nur leicht zu.

Ein Vergleich der Genotypen zeigt, dass durch Behandlung der AhR-Knockout-Mäuse mit TCDD die Expression der Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* statistisch signifikant höher anstieg als in Wildtyp-Mäusen. Die Genexpression von *Cyp2b10* in behandelten AhR^{-/-}-Tieren nahm im Vergleich zu behandelten AhR-Wildtyp-Tieren hochsignifikant zu. Eine Studie von Bui *et al.* (2012) kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Expression von *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* in den Milzen TCDD-behandelter (50 µg/kg KG) Wildtyp-Mäuse nahmen jeweils leicht ab, während in TCDD-behandelten (50 µg/kg KG) AhR-defizienten-Mäusen deren Expression leicht anstieg. Jedoch waren die Änderungen der Genexpression nicht signifikant (Bui *et al.*, 2012).

Die Ergebnisse der RT-PCR entsprechen nicht den Resultaten der Western Blots und des EROD-Assay. Die RT-PCR zeigte auf mRNA-Ebene keine Induktion der Gene *Cyp1a1* und *Cyp1a2* in behandelten Wildtyp-Mäusen. Auf Proteinebene zeigte der Western Blot und der EROD-Assay jedoch eine Induktion dieser Enzyme. Eine Induktion von *Cyp1b1* war weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene zu verzeichnen. In TCDD-behandelten Knockout-Mäusen zeigte die RT-PCR eine Induktion von *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* auf mRNA-Ebene. Durch die Western Blots und die EROD-Assays konnte eine Induktion dieser Enzyme auf Proteinebene bzw. eine Steigerung der Aktivität nicht bestätigt werden. Ein möglicher Mechanismus für die Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in den Milzen TCDD-behandelter AhR-defizienter Mäuse konnte bisher nicht gefunden werden.

Auf eine Darstellung der Daten der männlichen Mäuse wurde verzichtet, da aufgrund von Schwierigkeiten bei der Isolierung der mRNA aus der Milz zum Teil nur ein Stichprobenumfang von eins für die PCR-Messung zur Verfügung stand.

4.7.3 Genexpression der TopGO-Analyse in den Nieren

Um die Ergebnisse des Microarrays der Nieren zu verifizieren wurden einige Gene aus der Liste der 20 am häufigsten vorkommenden GO-Kategorien der *gene set enrichment*-Analyse ausgewählt und die Expression dieser Gene mittels RT-PCR überprüft. Aufgrund der geringen Anzahl männlicher AhR^{-/-}-Mäuse in der Zucht konnte die Genexpressionsanalyse nur mit einem Stichprobenumfang von zwei pro Behandlungsgruppe untersucht werden.

4.7.3.1 Genexpression von *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren

Die Microarray Daten der Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse zeigten eine erhöhte Expression der vier Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10*, die in die Prozesse der Blutgerinnung (GO:0007596, GO:0007599, GO:0050817) involviert sind. Nähere Informationen zu den Genen *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* sind den Ausführungen in Kapitel 4.5.4 zu entnehmen.

In Abbildung 73A ist die Genexpression der Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren weiblicher Mäuse gezeigt. Die Genexpression von *F10* ist im Rahmen der Diplomarbeit von Frau L.Vath (Vath, 2013) gemessen worden. Durch Behandlung weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse mit TCDD kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression von *Fgg* ($2,02 \pm 0,83$ -fach) und *Fgb* ($4,89 \pm 2,62$ -fach). Die *Serpinc1*-Genexpression nahm ebenfalls leicht zu. Die Expression von *F10* blieb unverändert durch die TCDD-Behandlung. In TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäusen kam es zu einer signifikanten Zunahme der Expression der Gene *Fgg* ($2,09 \pm 0,84$ -fach) und *F10* ($2,34 \pm 0,05$ -fach). Die Genexpression von

Serpinc1 ($3,13 \pm 2,38$ -fach) und *Fgb* ($4,03 \pm 3,13$ -fach) nahmen ebenfalls zu. Der Vergleich der Genotypen zeigt, dass die Genexpression von *Serpinc1*, *Fgg* und *Fgb* sowohl in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen wie auch in behandelten AhR-Knockout-Mäusen anstieg. Dahingegen nahm die *F10*-Genexpression in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu behandelten AhR-Knockout-Mäusen hochsignifikant ab.

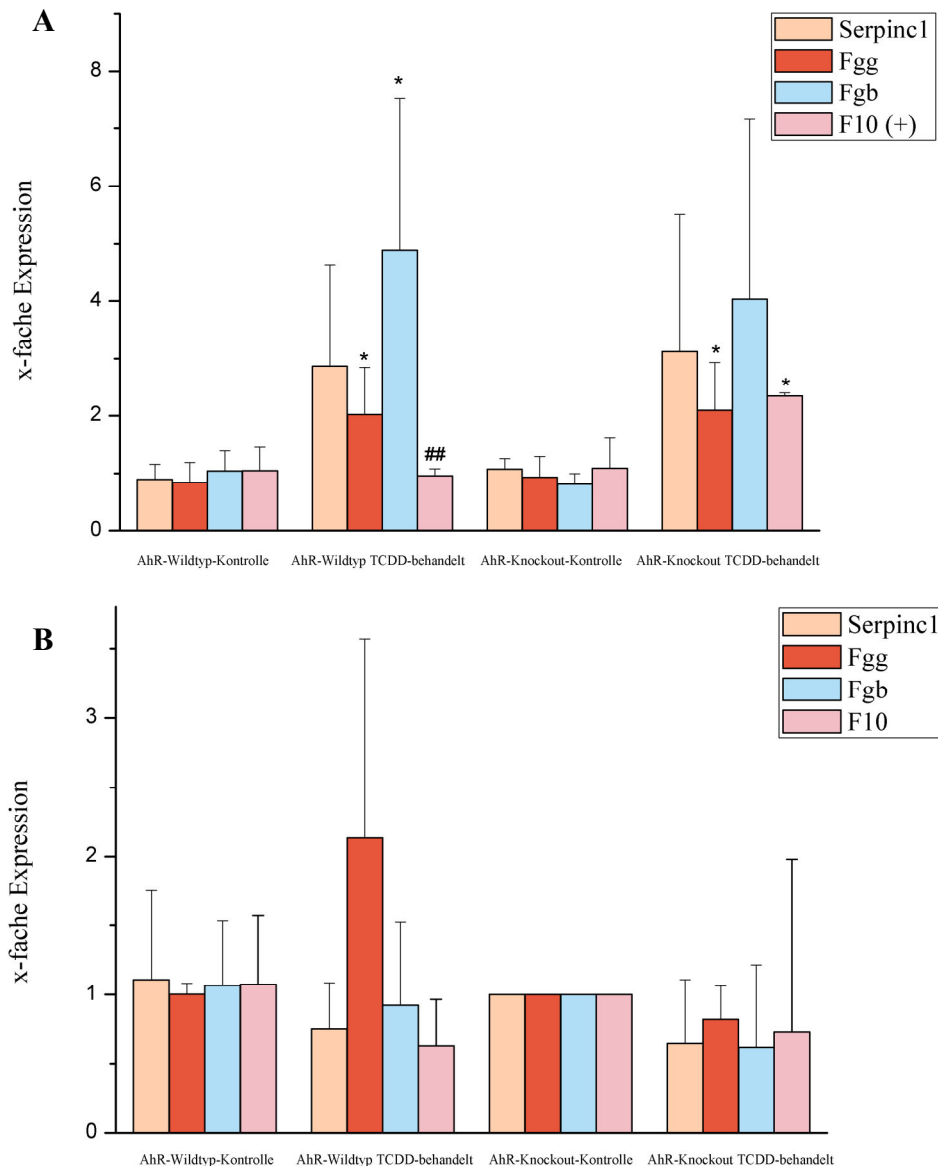


Abbildung 73: Genexpression (RT-PCR) von *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren **A)** weiblicher Mäuse und **B)** männlicher Mäuse; $3 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; (+) = Daten gemessen im Rahmen einer Diplomarbeit (Vath, 2013); One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

In Tabelle 61 sind die Ergebnisse des Microarrays für die Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren behandelter weiblicher Mäuse aufgeführt.

Tabelle 61: Microarray-Daten für die Gene *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren behandelter weiblicher AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Serpinc1</i>	1,62	2,01
<i>Fgg</i>	1,38	1,52
<i>Fgb</i>	1,24	1,84
<i>F10</i>	0,43	1,32

Die Ergebnisse des Microarrays und der RT-PCR zeigen übereinstimmend, dass die Genexpression von *Serpinc1*, *Fgg* und *Fgb* sowohl in behandelten Wildtyp-Mäusen wie auch in behandelten Knockout-Mäusen anstieg. Die Expression von *F10* nahm nur in behandelten Knockout-Mäusen signifikant zu. Die Ergebnisse von Microarray und RT-PCR lassen vermuten, dass *Serpinc1*, *Fgg* und *Fgb* AhR-unabhängig reguliert werden.

In Abbildung 73B ist die Genexpression von *Serpinc1*, *Fgg*, *Fgb* und *F10* in den Nieren **männlicher** Mäuse dargestellt. Ein Vergleich zwischen Weibchen und Männchen zeigte unterschiedliche Ergebnisse. In weiblichen TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen stieg in den Nieren die Expression der Gene *Serpinc1* leicht und von *Fgg* sowie *Fgb* signifikant an. Dies war in männlichen TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen nur bei *Fgg* zu beobachten, jedoch nicht signifikant. Die *F10*-Expression blieb durch Behandlung mit TCDD in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen unverändert, in männlichen Mäusen nahm sie leicht ab. Ein Geschlechtervergleich bei behandelten AhR-Knockout-Mäusen zeigt, dass es in den Weibchen zu einer erhöhten Expression aller vier Gene kam, in den Männchen dahingegen nicht. Hier nahm die Expression aller vier Gene leicht ab. Aufgrund der hohen Spannweiten der Werte sowie der geringen Anzahl männlicher AhR-Knockout-Mäuse, ist der Vergleich zwischen Weibchen und Männchen nur als Tendenz zu bewerten.

4.7.3.2 Genexpression von *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* in den Nieren

Die Microarray-Daten der Nieren weiblicher TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse zeigten eine erhöhte Expression der Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* (siehe Tabelle 62). Die Expression dieser Gene wurde daher weitergehend mittels RT-PCR untersucht. Diese fünf Gene sind in die Prozesse des blutbildenden Systems (GO:0034101,

GO:0030218, GO0048821, GO:0030099) involviert. Weitere Einzelheiten zu den Genen wurden bereits in Kapitel 4.5.4 beschrieben.

In Abbildung 74A ist die Genexpression von *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* in den Nieren weiblicher Tiere dargestellt. Die Behandlung von AhR^{+/+}-Mäusen mit TCDD verursachte eine signifikante Zunahme der Gene *Hba-a1* (2,53 ± 0,88-fach), *Hba-a2* (2,22 ± 0,74-fach) und *Hbb-b1* (2,92 ± 0,83-fach). Die Expression von *Rps14* nahm leicht zu. Dahingegen wies *Hbb-b2* eine geringere Genexpression auf. In AhR^{-/-}-Mäusen kam es durch TCDD zu einer signifikanten Zunahme der Gene *Hbb-b1* (4,01 ± 1,35-fach) und *Rps14* (1,42 ± 0,27-fach). Die Genexpression von *Hba-a1* zeigte einen hochsignifikanten Anstieg. Eine leichte Zunahme der *Hba-a2*- und *Hbb-b2*-Expression konnte ebenfalls beobachtet werden. Ein Vergleich beider Genotypen zeigte, dass die Expression von *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Rps14* sowohl in behandelten AhR^{+/+}-Mäusen wie auch in behandelten AhR^{-/-}-Mäusen anstieg. Dagegen war eine erhöhte *Hbb-b2*-Genexpression nur in behandelten AhR^{-/-}-Mäusen zu beobachten. Diese war signifikant erhöht im Vergleich zu den behandelten AhR^{+/+}-Mäusen.

Die Daten des Microarrays (Tabelle 62) zeigen ähnliche Ergebnisse. Wie auch in der RT-PCR der weiblichen Mäuse beobachtet, nahm die Expression der Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Rps14* in den behandelten AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäusen zu. Die Expression von *Hbb-b2* war in den behandelten AhR^{+/+}-Mäusen nur im Microarray leicht erhöht. In der RT-PCR nahm diese hingegen leicht ab. In behandelten AhR^{-/-}-Mäusen nahm die *Hbb-b2*-Expression sowohl im Microarray als auch in der RT-PCR zu.

Tabelle 62: Microarray-Daten für die Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* in den Nieren weiblicher TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Hba-a1</i>	1,17	1,05
<i>Hba-a2</i>	1,05	1,27
<i>Hbb-b1</i>	0,92	1,4
<i>Hbb-b2</i>	1,03	1,38
<i>Rps14</i>	0,67	1,01

Aus den Daten von Microarray und RT-PCR lässt sich schließen, dass die Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* AhR-unabhängig reguliert werden.

In Abbildung 74B ist die Genexpression von *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* in den Nieren männlicher Mäuse dargestellt. Ein Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Mäusen zeigte, dass in weiblichen behandelten AhR^{-/-}-Mäusen die Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* leicht hochreguliert wurden, während sich die Expression der fünf Gene in behandelten männlichen AhR^{-/-}-Mäusen kaum veränderten. Ein vergleichbares Ergebnis war auch in AhR^{+/+}-Mäusen zu beobachten. In behandelten

männlichen Mäusen war eine verminderte Expression aller fünf Gene zu beobachten, während in weiblichen Mäusen die Expression der Gene *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Rps14* durch TCDD dagegen leicht anstieg.

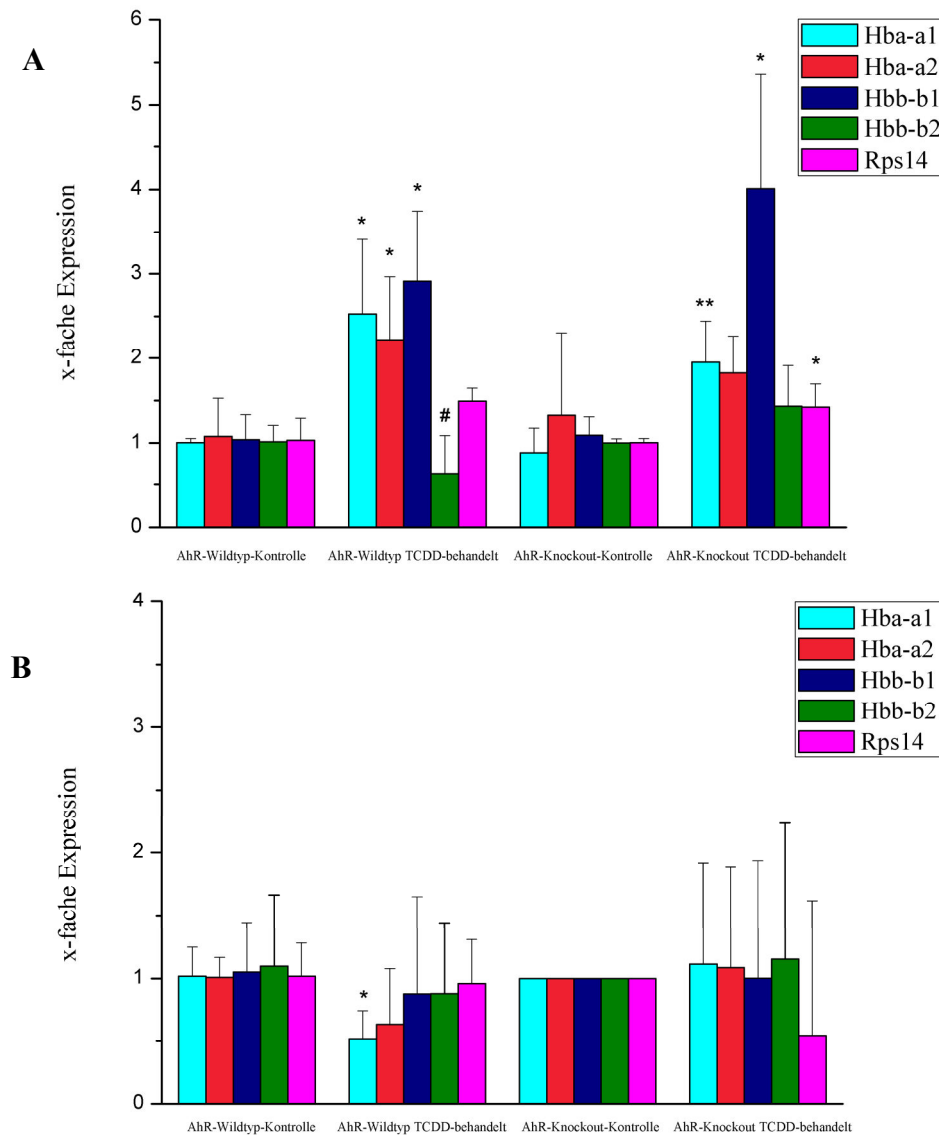


Abbildung 74: Genexpression (RT-PCR) von *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Rps14* in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

4.7.3.3 Genexpression von *Tdo2* in den Nieren

Die Daten des Microarrays zeigten, dass TCDD die Genexpression von *Tdo2* in den Nieren weiblicher AhR-Wildtyp- und Ahr-defizienter-Mäuse induzierte. *Tdo2* ist, wie in der topGO-

Analyse gezeigt wurde, in die Prozesse *carboxylic acid catabolic process* (GO:0046395) und *organic acid catabolic process* (GO:0016054) involviert. Beide Prozesse zählten zu den 20 häufigsten *GO*-terms in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse. Die Expression von *Tdo2* in den Nieren weiblicher und männlicher AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse wurden daher mittels RT-PCR weiterführend untersucht. In Abbildung 75 ist die *Tdo2*-Expression dargestellt. Weitere Details zum Gen *Tdo2* wurden in Kapitel 4.5.4 beschrieben.

TCDD induzierte in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen hochsignifikant *Tdo2* ($20 \pm 6,99$ -fach). In männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen war eine Zunahme der Expression auf $5,98 \pm 6,63$ -fach zu beobachten. Ein Vergleich zwischen weiblichen und männlichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen zeigte, dass die *Tdo2*-Expression in den Weibchen signifikant höher war als in den Männchen. Eine TCDD-vermittelte Zunahme der *Tdo2*-Expression war auch in weiblichen AhR-defizienten-Mäusen zu erkennen. In männlichen AhR-defizienten-Mäusen war hingegen keine veränderte Genexpression zu verzeichnen.

Ein Vergleich der beiden Genotypen zeigt, dass die Expression von *Tdo2* in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen stärker anstieg als in weiblichen AhR-defizienten-Mäusen nach Behandlung mit TCDD. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

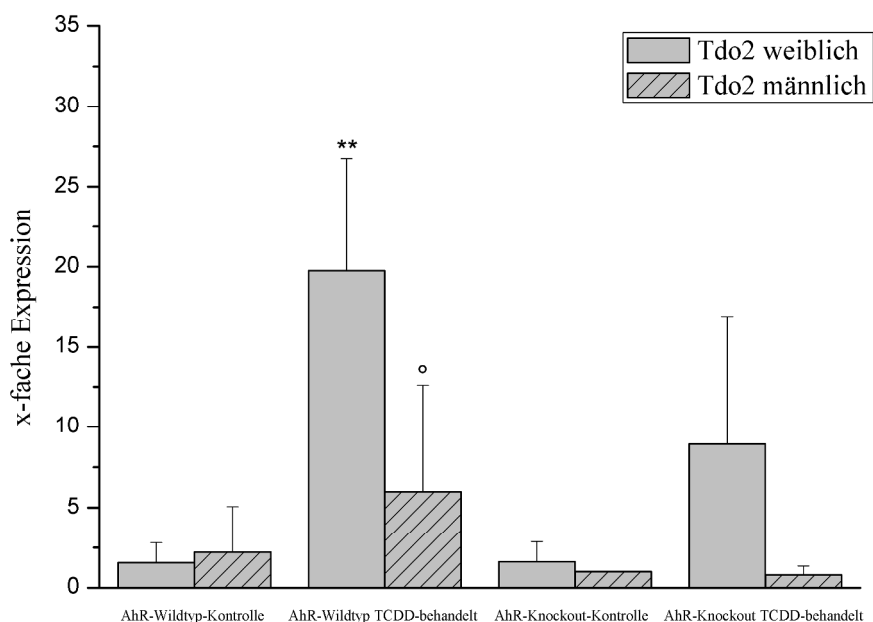


Abbildung 75: Genexpression (RT-PCR) von *Tdo2* in den Nieren weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; ** = $p \leq 0,01$ (Kontroll-Tier vs. TCDD-behandeltes Tier); ° = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt weiblich vs. männlich)

Ein Vergleich der RT-PCR-Ergebnisse der weiblichen Mäuse mit denen des Microarrays (Tabelle 63) zeigte ähnliche Resultate. Die *Tdo2*-Expression nahm sowohl in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen wie auch in behandelten AhR-defizienten-Mäusen zu. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Regulierung der *Tdo2*-Expression AhR-unabhängig vermittelt wird.

Tabelle 63: Microarray-Daten für das Gen *Tdo2* in den Nieren weiblicher TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als *log₂ fc*

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Tdo2</i>	1,03	1,14

4.7.4 Genexpression der topGO-Analyse in den Lebern

Die Ergebnisse des Microarrays der Lebern zeigten, dass eine Vielzahl von Genen in TCDD-behandelten AhR^{-/-}-Mäusen hoch- und herunterreguliert wurden (Lohr, 2013). Um diese Microarray-Resultate zu verifizieren wurden einige Gene aus der Liste der 20 am häufigsten vorkommenden *GO terms* der *GO*-Analyse der Lebern ausgewählt und die Expression dieser Gene mit RT-PCR überprüft. Wie bereits erwähnt wurde, konnte Genexpressionsanalyse bei AhR^{-/-}-Kontrollmäusen wie auch bei TCDD-behandelten AhR^{-/-}-Mäusen wegen der geringen Anzahl männlicher AhR^{-/-}-Mäuse in der Zucht nur mit einem Stichprobenumfang von zwei durchgeführt werden.

4.7.4.1 Genexpression der Gene *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* in den Lebern

In Folgenden wird die Expression der Gene *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse untersucht. Diese Gene sind am Prozess der Erythrozytenbildung (GO:0048821) beteiligt. Die Ergebnisse des Microarray wiesen auf eine erhöhte Expression dieser Gene in den Lebern TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse hin (Lohr, 2013). Nähere Informationen zu diesen drei Genen sind in Kapitel 4.5.4 zu finden. In Abbildung 76A ist die Expression der Gene *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* in den Lebern weiblicher Mäuse gezeigt. In den weiblichen TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäusen war eine leichte Zunahme der Expression von *Hbb-b1* zu erkennen. Die Expression von *Hbb-b2* und *Hba-a2* nahm durch TCDD-Behandlung der AhR^{+/+}-Mäusen leicht ab. In weiblichen AhR^{-/-}-Mäusen kam es durch TCDD zu einer leichten, aber nicht signifikanten Steigerung der Genexpression von *Hbb-b1* (2,45 ± 1,14-fach) und *Hba-a2* (1,99 ± 1,34-fach). Die *Hbb-b2*-Expression veränderte sich durch die TCDD-Behandlung kaum. Ein Vergleich der beiden Genotypen zeigt, dass die Expression von *Hbb-b2* in weiblichen TCDD-behandelten AhR^{-/-}-Mäusen signifikant höher war als in behandelten AhR^{+/+}-Mäusen.

In Tabelle 64 sind die Ergebnisse des Microarrays für die Gene *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Hba-a2* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter Mäuse aufgeführt (Lohr, 2013).

Die Ergebnisse der RT-PCR weichen etwas von denen des Microarray ab. Im Microarray war die Expression der Gene *Hbb-b1* und *Hbb-b2* in behandelten AhR^{+/+}-Mäusen leicht erhöht und die *Hba-a2*-Expression signifikant erhöht (Lohr, 2013). In der RT-PCR war nur das Gen *Hbb-b1* leicht, aber nicht signifikant induziert. Die Expression von *Hbb-b2* und *Hba-a2* fiel durch Behandlung mit TCDD leicht ab.

Tabelle 64: Microarray-Daten für die Gene *Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Hba-a2* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelten AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$ (Lohr, 2013)

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Hbb-b1</i>	0,38	1,25
<i>Hbb-b2</i>	0,70	1,22
<i>Hba-a2</i>	1,08	1,09

Die RT-PCR weiblicher Mäuse zeigte, dass in behandelten AhR^{-/-}-Mäusen die Expression von *Hbb-b1* und *Hba-a2* leicht, aber nicht signifikant erhöht war. Die *Hbb-b2*-Expression war kaum verändert. Im Microarray dagegen wurden alle drei Gene signifikant induziert (Lohr, 2013).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gene *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* AhR-unabhängig reguliert werden. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Genexpressionanalyse in den Nieren (siehe Kapitel 4.7.3.2).

Abbildung 76B zeigt die Expression der Gene *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* in den Lebern **männlicher** Mäuse. In männlichen Mäusen war ähnliches wie in weiblichen Mäusen zu beobachten. Die Genexpression von *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* nahm nur in behandelten AhR^{-/-}-Mäusen zu. In behandelten AhR^{+/+}-Mäusen veränderte sie sich kaum.

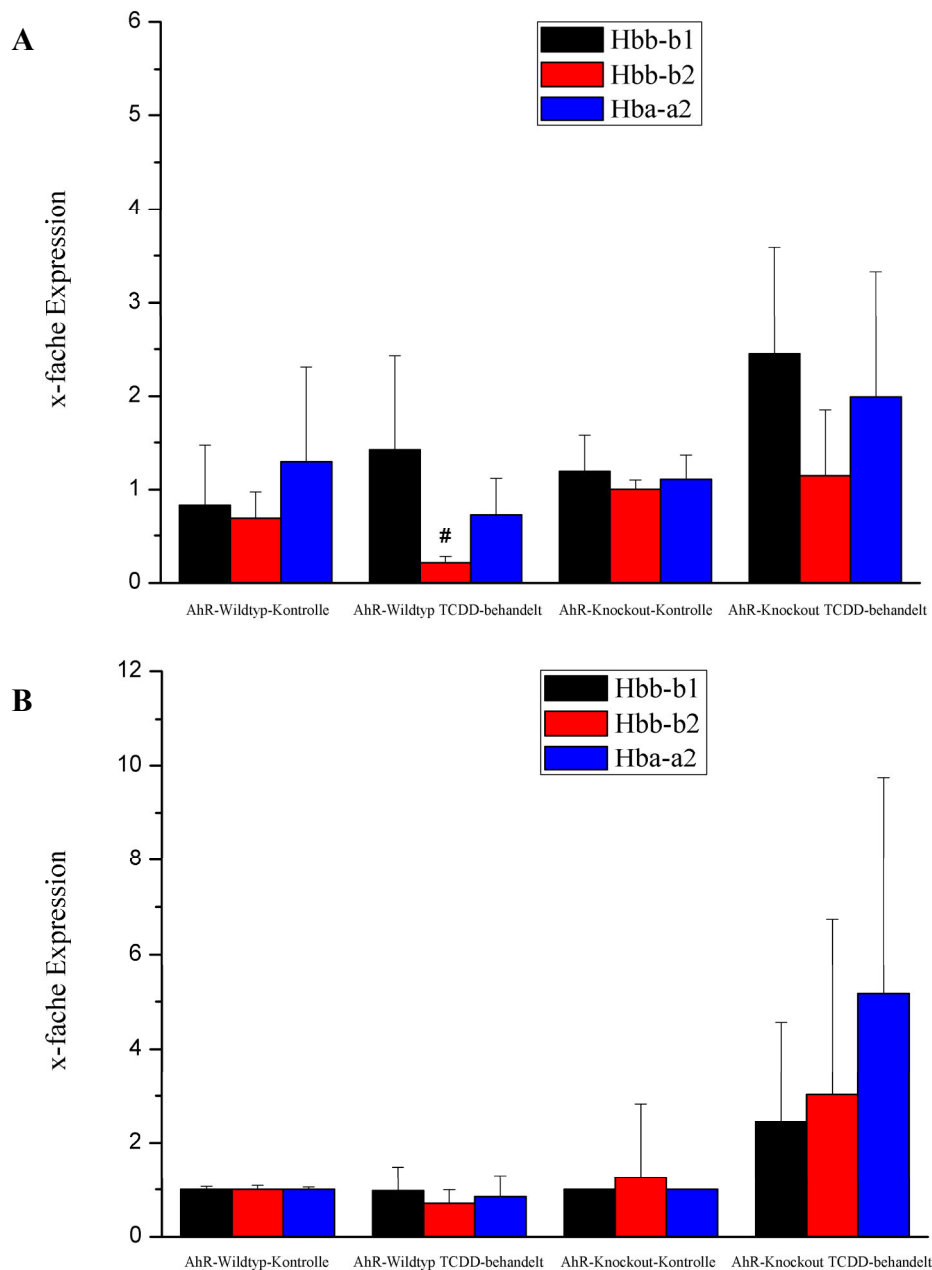


Abbildung 76: Genexpression (RT-PCR) von *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* in den Lebern **A)** weiblicher Mäuse und **B)** männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

4.7.4.2 Genexpression von *Lpl* in den Lebern

Die Microarray-Analyse der Lebern TCDD-behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse zeigte in beiden Genotypen eine erhöhte Expression von *Lpl* (Lipoproteinlipase, Lpl; Lohr, 2013). Um die Ergebnisse des Microarray zu bestätigen wurde daher die Genexpression von *Lpl* in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse mittels RT-PCR überprüft.

Lpl codiert für das Enzym Lpl, für welches zwei Funktionen bekannt sind. Zum einen katalysiert Lpl die Hydrolyse von Triglyceriden, zum anderen dient Lpl als Ligand/Bindungs-Faktor für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen (Mead *et al.* 2002). In Abbildung 77 ist die Genexpression von *Lpl* in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse dargestellt. Durch Behandlung weiblicher AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse mit TCDD, kam es zu einer Steigerung der Genexpression von *Lpl* in beiden Genotypen. Die Expression stieg in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen signifikant auf $4,74 \pm 3,06$ -fach an und in weiblichen AhR-defizienter-Mäusen hochsignifikant auf $7,15 \pm 1,56$ -fach. Die Expression von *Lpl* nahm nur in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen leicht auf $1,94 \pm 0,47$ -fach zu.

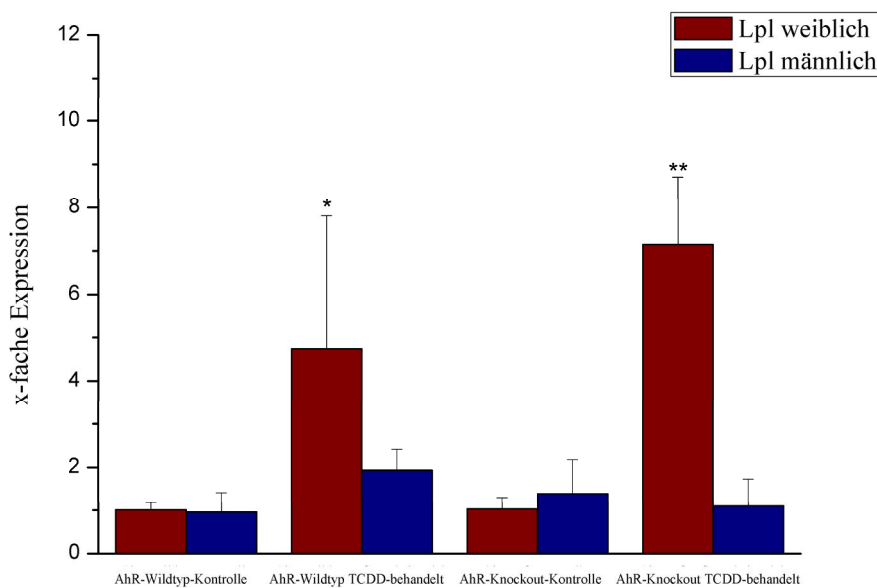


Abbildung 77: Genexpression (RT-PCR) von *Lpl* in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Correction; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt)

In männlichen behandelten AhR-defizienten-Mäusen veränderte sich die Expression von *Lpl* kaum. Ein Vergleich mit dem Ergebnis des Microarrays (Tabelle 65) zeigte, dass es unter Einwirkung von TCDD sowohl in weiblichen AhR-Wildtyp- wie auch in weiblichen AhR-defizienten-Mäusen zu einer Steigerung der *Lpl*-Expression kam.

Tabelle 65: Microarray-Daten für das Gen *Lpl* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$ (Lohr, 2013)

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Lpl</i>	1,01	1,07

Die Daten von Microarray und RT-PCR weiblicher Mäuse zeigten, dass die TCDD-induzierte Genexpression von *Lpl* höchstwahrscheinlich AhR-unabhängig reguliert wurde. Gegensätzliches wurde in einer Studie von Minami *et al.* beschrieben. Eine erhöhte Expression von *Lpl* wurde nur in TCDD-behandelten (35 µg/kg KG pro Tag für 4 Tage) AhR-Wildtyp-Mäusen und nicht in TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen (Austausch Exon 1) beobachtet. Da in Ahr-defizienten-Kontrollmäusen eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu AhR-Wildtyp Kontrollmäusen beobachtet werden konnte, wurde vermutet, dass der AhR in Abwesenheit eines Liganden die Expression von *Lpl* unterdrückt, oder dass er einen Suppressor, der die *Lpl*-Expression beeinflusst, reguliert (Minami *et al.*, 2008). Ein Vergleich von Kontrollmäusen beider Genotypen in den eigenen Daten zeigte keinen signifikanten Unterschied im Expressionslevel von *Lpl*.

4.7.4.3 Genexpression von *Anxa1* und *Pla2g4a* in den Lebern

Die Auswertung der Microarray-Daten zeigte, dass in den Lebern TCDD-behandelter AhR^{-/-}-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle die Expression der Gene *Anxa1* und *Pla2g4a* signifikant erhöht war (Lohr, 2013). Die Gene *Anxa1* und *Pla2g4a* sind in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse in die Biosynthese von Prostaglandinen (GO:0031392, GO:0031394) und in die Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren (GO:2001279, GO:2001280) involviert (Lohr, 2013). Um die Resultate des Microarray zu verifizieren wurde daher die Genexpression dieser beiden Gene mittels RT-PCR weitergehend untersucht. *Anxa1* codiert das 37 kDa große Protein Annexin A1, auch Lipocortin-1 genannt, das zur Familie der Ca²⁺-abhängigen Phospholipidbindenden-Proteine gehört. Sie werden mit einer Reihe von zellulären Funktionen wie der Signaltransduktion, Ionenkanalbildung und Apoptose in Verbindung gebracht (Moss, 1995). Lipocortin-1 ist ein Steroid-reguliertes Protein und wird mit einigen Glucocorticoid-Wirkungen wie z. B. der Inhibition der Zellproliferation und anti-inflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht (Flower und Rothwell, 1994).

Pla2g4a codiert eine Isoform der zytosolischen Phospholipase A2 Gruppe 4 Familie, die die Hydrolyse von Membranphospholipiden katalysieren wobei Fettsäuren wie z. B. Arachidonsäure freigesetzt werden. Das Enzym wird durch einen erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Level und Phosphorylierung aktiviert und transloziert vom Zytosol in den Zellkern (Dennis, 1994).

Die Genexpression von *Anxa1* und *Pla2g4a* in den Lebern **weiblicher** und **männlicher** Mäuse ist in Abbildung 78 dargestellt. Durch Behandlung weiblicher AhR^{+/+}-Mäuse mit TCDD veränderte sich die Expression von *Pla2g4a* kaum, die Expression von *Anxa1* nahm leicht zu. Bei den männlichen AhR^{+/+}-Mäusen gab es die gleichen Befunde.

In weiblichen AhR^{-/-}-Mäusen führte die Behandlung mit TCDD hingegen zu einer signifikanten Steigerung der *Anxa1*-Expression. Die Expression von *Pla2g4a* nahm nur leicht auf 1,66 ± 0,43-fach zu. Dies deutet auf eine AhR-unabhängige Regulierung hin. In einer

Studie von Kinehara *et al.* (2008) wurde hingegen eine AhR-abhängige Regulierung vermutet, da der *Pla2g4a*-Promotor eine DRE-Sequenz zur Bindung des AhR aufweist und die *Pla2g4a*-Expression in TCDD-behandelten Hepa-1c1c7 Zellen (murine Hepatomzellen) im Vergleich zur Kontrolle signifikant anstieg (Kinehara *et al.*, 2008).

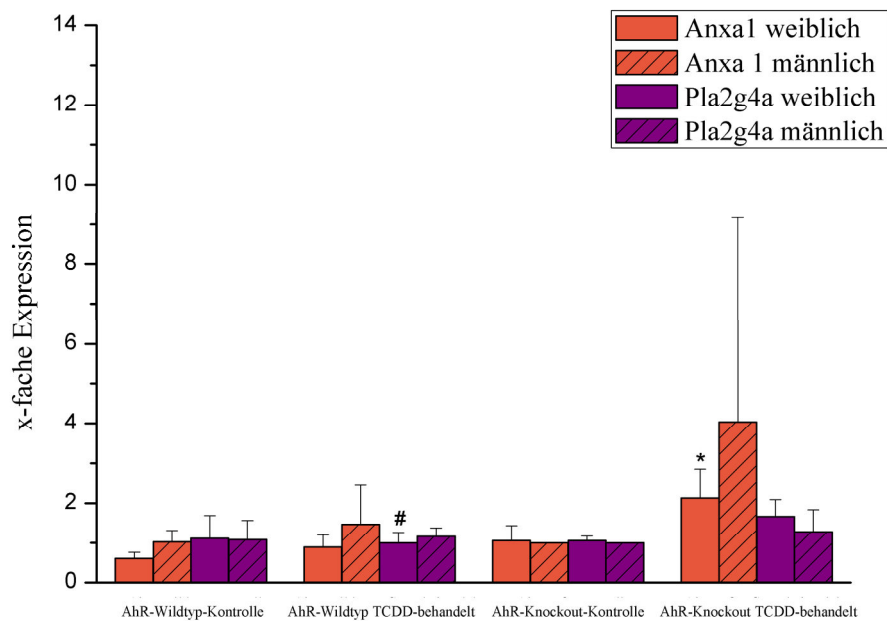


Abbildung 78: Genexpression (RT-PCR) von *Anxa1* und *Pla2g4a* in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

In TCDD-behandelten AhR^{-/-}-Männchen stieg die *Anxa1*-Expression ($4,04 \pm 5,13$ -fach) leicht an und die *Pla2g4a*-Expression ($1,27 \pm 0,56$ -fach) veränderte sich kaum. Ein Vergleich der Genotypen zeigt, dass die Genexpression von *Pla2g4a* in den Lebern weiblicher AhR^{-/-}-Mäuse signifikant höher war als in TCDD-behandelten AhR^{+/+}-Mäusen. In Tabelle 66 sind die Ergebnisse des Microarray für die Gene *Anxa1* und *Pla2g4a* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter Mäuse aufgeführt (Lohr, 2013).

Tabelle 66: Microarray für die Gene *Anxa1* und *Pla2g4a* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$ (Lohr, 2013)

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Anxa1</i>	0,66	1,43
<i>Pla2g4a</i>	0,18	1,23

Ein Vergleich mit den Microarray-Ergebnissen zeigt, dass es durch die TCDD-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Gene *Anxal* und *Pla2g4a* in den Lebern behandelte weiblicher AhR^{-/-}-Mäuse kam (Lohr, 2013). Ähnliches bestätigen auch die Resultate der RT-PCR. Dies deutet auf eine AhR-unabhängige Regulierung der Gene *Pla2g4a* und *Anxal* durch TCDD hin.

4.7.5 Genexpression von *c-Myc* in Leber, Niere, Lunge und Milz

Der Transkriptionsfaktor *c-Myc* gehört zu den am stärksten amplifizierten Onkogenen in vielen verschiedenen Krebsarten (Beroukhim *et al.*, 2010). *c-Myc* wird mit der Regulation der Expression von ca. 10-15 % aller Gene im Menschen in Verbindung gebracht. Obwohl *c-Myc* damit eher als globaler Regulator der Transkription wirkt, gibt es bestimmte Gruppen von Genen, die im Netzwerk der *c-Myc*-Zielgene stärker repräsentiert sind als andere. Dazu zählen unter anderem Gene, die an der Zellzyklusregulation, am Metabolismus und an der Synthese von Ribosomen und Proteinen beteiligt sind. Außerdem hemmt *c-Myc* die Expression von Genen, die einen Wachstumsstopp bzw. Zellzyklusarrest und die Adhäsion von Zellen bewirken (Dang *et al.*, 2006). Die *c-Myc*-Expression wird dabei von Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF sowie durch Interferone, Interleukine, Retinoide, Steroidhormone und Vitamin D beeinflusst (Levens, 2010).

c-Myc wies in den Microarray-Ergebnissen eine erhöhte Expression in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse auf (Lohr, 2013). Allerdings wurde *c-Myc* bei der Auswertung der Microarray-Daten in den Lebern als nicht hochreguliert deklariert (falsch negativ). Aufgrund des hohen Signifikanzwertes der *c-Myc*-Expression in den Nieren ($p = 0,9$ bei AhR-Wildtyp und $p = 0,19$ bei AhR-defizient) TCDD-behandelter AhR-Wildtyp- und AhR-defizienter-Mäuse fiel *c-Myc* nach Anwendung der *Cut-Off*-Kriterien aus der Auswertung heraus. In Tabelle 67 sind die Ergebnisse des Microarray für *c-Myc* in den Lebern (Lohr, 2013) und Nieren TCDD-behandelter Mäuse aufgeführt.

Tabelle 67: Microarray für das Gen *c-myc* in den Lebern (Lohr, 2013) und in den Nieren TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt
	AhR ^{+/+}	AhR ^{-/-}	AhR ^{+/+}	AhR ^{-/-}
	Leber		Niere	
<i>c-Myc</i>	1,1	1,43	- 0,05	- 0,53

Wie in Tabelle 67 zu sehen ist, nahm die Expression von *c-Myc* in den Lebern behandelte AhR-defizienter-Mäuse stärker zu als in behandelte AhR-Wildtyp-Mäusen (Lohr, 2013). In

den Nieren behandelter Mäuse nahm die *c-Myc*-Expression leicht ab. In einer Studie von Yang *et al.* konnte an transfizierten Hs578T-Zellen gezeigt werden, dass der *c-Myc*-Promotor sechs AhR-Bindungsstellen besitzt sowie dass ein konstitutiv aktiver AhR an den *c-Myc*-Promotor bindet und die *c-Myc*-Transkription hemmt. Eine Behandlung der Zellen mit TCDD bewirkte keine erhöhte Bindung des Rezeptors an den Promotor (Yang *et al.*, 2005). Möglicherweise könnte dies ein Grund dafür sein, dass die *c-Myc*-Expression in den behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen niedriger war als in den AhR-defizienten-Mäusen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Genexpression von *c-Myc* in Leber, Niere, Lunge und Milz mittels RT-PCR untersucht. Abbildung 79A zeigt die Expression von *c-Myc* in den Organen **weiblicher** Mäuse. Durch TCDD-Behandlung von AhR-Wildtyp-Mäusen kam es in den Lebern und den Nieren zu einer leichten Zunahme der *c-Myc*-Expression. Die Expression in den Lungen veränderte sich dagegen kaum. In den Milzen nahm die Expression signifikant zu. Bei Betrachtung der Ergebnisse behandelter AhR-defizienter-Mäuse, so waren eine signifikante Zunahme in den Lebern und eine signifikante Abnahme in den Milzen zu beobachten. In den Nieren und Lungen nahm die Expression leicht ab. Ein Vergleich der Genotypen zeigt, dass die *c-Myc*-Expression in Lunge und Milz behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse hochsignifikant höher war als in den Lungen und Milzen behandelter AhR-defizienter-Mäuse. Weiterhin ist zu beobachten, dass die *c-Myc*-Expression in den Lebern behandelter AhR-defizienter-Mäuse höher anstieg als in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen, jedoch nicht signifikant. Die RT-PCR-Resultate bestätigen zum Teil die Microarray-Ergebnisse (Tabelle 67). Die *c-Myc*-Expression in den Nieren (siehe Abbildung 79A) in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen nahm leicht zu, dies war in den Microarray-Daten nicht der Fall. Dort veränderte sich die Expression kaum. In einer Studie von Yang *et al.* (2005) konnte an transfizierten Hs578T-Zellen gezeigt werden, dass TCDD keine erhöhte *c-Myc*-Expression bewirkte. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte *c-Myc*-Expression in den Lebern behandelter AhR-defizienter-Mäuse der eigenen Untersuchungen eher indirekt durch einen TCDD-aktivierten Signalweg ausgelöst wurde, als direkt durch TCDD.

Abbildung 79B zeigt die *c-Myc*-Expression in den Organen **männlicher** Mäuse. Ein Vergleich zwischen Weibchen und Männchen zeigte geschlechtsspezifische Unterschiede. Während die *c-Myc*-Expression in Leber, Niere und Lunge nach Behandlung mit TCDD in weiblichen und männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen leicht ansteigt, nahm die Expression in den Milzen nur in männlichen AhR-Wildtyp-Tieren ab, während sie in weiblichen Tieren signifikant anstieg. Es ist aber zu beachten, dass die Genexpressionswerte der Milzen männlicher behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse (Stichprobenumfang von eins) nur als Tendenz zu betrachten sind und somit keine eindeutige Aussage gemacht werden kann.

In weiblichen AhR-defizienten-Mäusen nahm die Expression von *c-Myc* nur in den Lebern signifikant zu, in den anderen Organen nahm sie leicht ab. Dies war in männlichen AhR-defizienten-Mäusen nicht zu beobachten, denn hier nahm die *c-Myc*-Expression nur in den

Milzen durch Behandlung mit TCDD zu. In den Lebern nahm sie leicht ab, während sie sich in den Nieren und Lungen kaum veränderte.

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen keine eindeutige Aussage zu, ob die TCDD-induzierte Änderung der *c-Myc*-Expression AhR-abhängig oder -unabhängig ist.

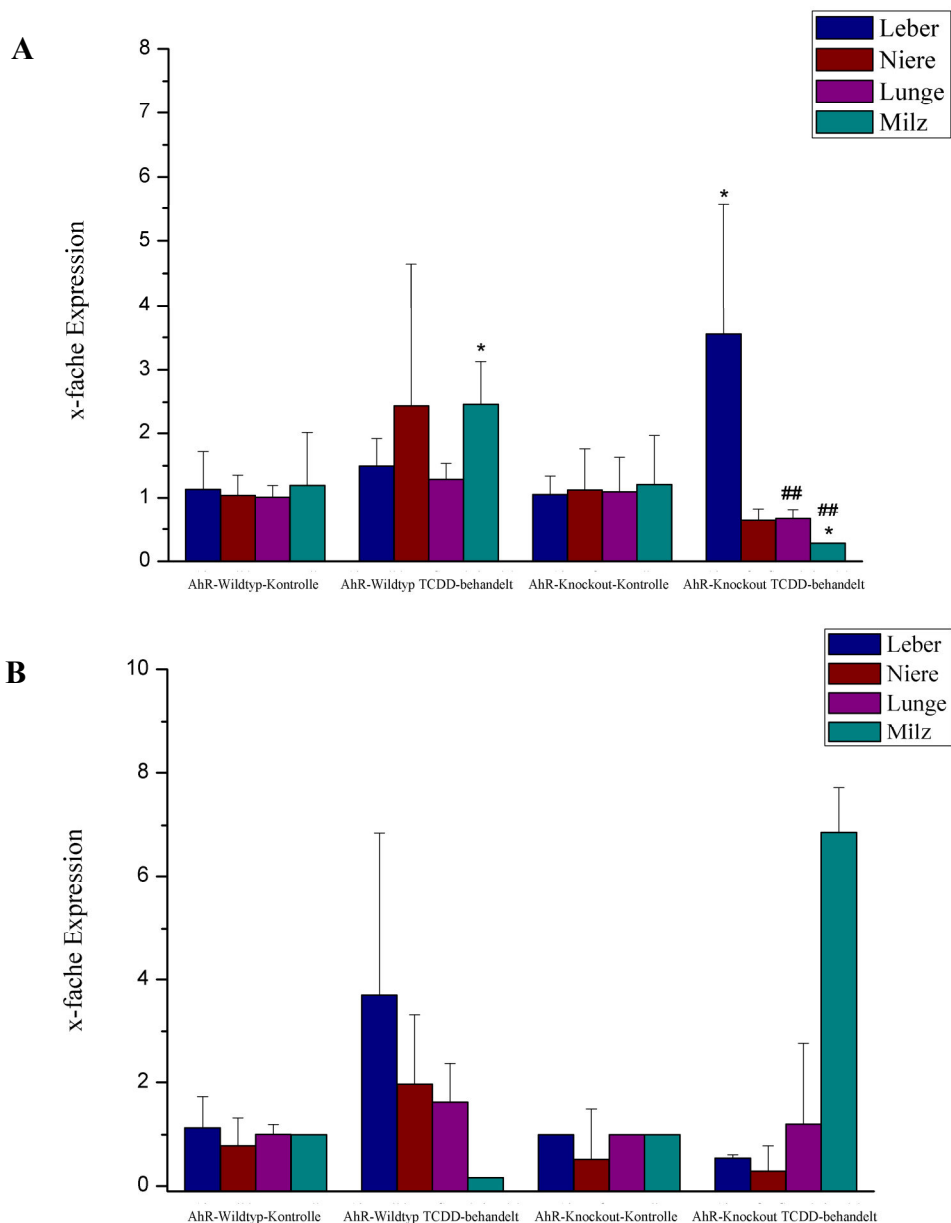


Abbildung 79: Expression (RT-PCR) von *c-Myc* in den unterschiedlichen Organen A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $1 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

4.7.6 Genexpression der von c-Myc möglicherweise regulierten Gene

Wie in der Literatur beschrieben ist wird c-Myc mit einer Vielzahl an Genen in Verbindung gebracht. Um einen Überblick zu erhalten wurde zunächst in der Literatur nach Genen gesucht, die in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse regulierten waren und mit c-Myc in Verbindung gebracht werden konnten. In Tabelle 68 sind die Gene mit der entsprechenden Literaturquelle aufgeführt.

Tabelle 68: Liste der Gene, die mit c-Myc in Verbindung gebracht werden können und die entsprechende Literatur

Gen	Literatur
<i>Afp</i>	Mazure <i>et al.</i> , (2002)
<i>Asns</i>	O'Connell <i>et al.</i> , (2003)
<i>Gcnt1</i>	O'Connell <i>et al.</i> , (2003)
<i>Ctgf</i>	Coller <i>et al.</i> , (2000); Schuhmacher <i>et al.</i> , (2001)
<i>Fabp5</i>	Coller <i>et al.</i> , (2000)
<i>Col3a1</i>	Coller <i>et al.</i> , (2000)
<i>Colla1</i>	O'Connell <i>et al.</i> , (2003)
<i>Dntt</i>	Mai und Mårtensson, (1995)
<i>Tfrc</i>	Ellwood-Yen <i>et al.</i> , (2003)
<i>E2f3</i>	Adams <i>et al.</i> , (2000)
<i>Pla2g4a</i>	Li <i>et al.</i> , (2003)
<i>Slc20a1</i>	Schuhmacher <i>et al.</i> , (2001)
<i>Gnb1l</i>	Li <i>et al.</i> , (2003)
<i>Ctps</i>	Schuhmacher <i>et al.</i> , (2001)
<i>Mcm6</i>	Watson <i>et al.</i> , (2002)
<i>Sdcbp</i>	O'Connell <i>et al.</i> , (2003)
<i>F3</i>	Louro <i>et al.</i> , (2002)
<i>Prkdc</i>	Fernandez <i>et al.</i> , (2003)
<i>Isg20</i>	Fernandez <i>et al.</i> , (2003)
<i>Jun</i>	Fernandez <i>et al.</i> , (2003)
<i>Pdk1</i>	Li <i>et al.</i> , (2003)
<i>Slc26A4</i>	Li <i>et al.</i> , (2003)

Aus dieser Liste wurden einige Gene, die zu den am stärksten regulierten Genen in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse zählten, ausgewählt und deren Expression in Leber und Niere weiblicher und männlicher Mäuse mittels RT-PCR weitergehend untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden Kapitel (4.7.6.1) gezeigt.

4.7.6.1 Genexpression der von c-Myc möglicherweise regulierten Gene in Leber und Niere

Im Einzelnen wurden die Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Lebern von AhR-Wildtyp- und AhR-Knockout-Mäusen mittels RT-PCR überprüft. Das Gen *Afp* codiert das fetale α -Fetoprotein, das als ein Biomarker bei Leberzellkarzinomen (HCC) angesehen wird. Eine erhöhte *Afp*-Expression korreliert dabei mit aggressivem Tumorverhalten. Einflüsse auf Zelldifferenzierung und -proliferation sowie auf die Angiogenese und Apoptose wurden dabei festgestellt (Mitsuhashi *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010). In einer Studie von Sotnichenko *et al.* (1999) wurde berichtet, dass das α -Fetoprotein einen stabilen, nicht-kovalenten Komplex mit TCDD bildete. Die Wasser-löslichkeit dieses, aus zwei TCDD- und einem *Afp*-Molekül bestehenden Komplexes, war im Vergleich zu reinem TCDD um den Faktor 10^5 höher und zeigte *in vitro* in humanen Tumorzelllinien (CEM, MCF-7, HepG2) eine bis zu 1400-fach höhere Toxizität. Es wird vermutet, dass TCDD durch diese Komplexbildung in embryonale Gewebe transportiert wird und dadurch seine embryotoxische und teratogene Wirkung vermittelt (Sotnichenko *et al.*, 1999). *Afp* ist eines der Gene mit der höchsten Expressionszunahme in den Lebern von TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäusen (Lohr, 2013). *Asns* codiert das Enzym Asparagin-Synthetase, das die ATP-abhängige Synthese von L-Asparagin aus L-Aspartat katalysiert. *Asns* wird in allen Säugetierorganen exprimiert, teils aber mit geringen Expressionsraten. Eine erhöhte *Asns*-Expression wird unter anderem durch Zellstress verursacht und führt bei akuter lymphoblastischer Leukämie im Kindesalter zu einer Resistenz gegenüber Asparagin (Richards & Kilberg 2006, Balasubramanian *et al.* 2013). *E2f3* codiert den Transkriptionsfaktor E2f3, der in der Regulation des Zellzyklus durch Einleitung in die S-Phase eine wichtige Rolle spielt. Es wird vermutet, dass die E2f3 Transkriptionsaktivität eine wichtige Rolle während des Zellzyklus proliferierender Zellen spielt. Dies geschieht durch Expressionskontrolle von Genen, deren Produkte der limitierende Faktor für die Initiation der DNA-Replikation und Zellzyklusregulierung sind (Leone *et al.*, 1998). E2f3 bindet an die Ziel-DNA als Heterodimer, welches aus dem E2f3-Protein und einem DP-Protein besteht. Die transkriptionelle Aktivität von E2f3/DP wird durch Bindung des Tumor-Suppressor-Proteins Rb (Retinoblastom-Protein) inhibiert. Rb schützt die Zelle davor, beschädigte DNA zu replizieren und verhindert den Übergang von der G₁- zur S-Phase (Wu *et al.*, 1995). In einer Studie von Adams *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass der *E2f3*-Lokus zwei Proteine codiert. Das E2f3a-Protein wird durch das Zellwachstum reguliert und das E2f3b-Protein während des Zellzyklus konstitutiv exprimiert (Adams *et al.*, 2000).

In Abbildung **80A** ist die Expression der Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Lebern **weiblicher** Mäuse dargestellt. Die Daten des Gens *Asns* wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Vath, 2013) gemessen. Durch Behandlung von AhR-Wildtyp-Mäusen mit TCDD kam es zu einer leichten Zunahme der Expression der Gene *Afp* und *Asns*. Dagegen veränderte sich die Genexpression von *Pla2g4a* kaum. Die *E2f3*-Expression nahm im

Vergleich zur AhR-Wildtyp-Kontrolle signifikant ab. Betrachtet man die TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäuse, so ist zu erkennen, dass die Expression von *Afp* ($9,03 \pm 2,96$ -fach) und *Asns* ($5,4 \pm 2,98$ -fach) im Vergleich zur Kontrolle signifikant zunahm. Die Expression der Gene *E2f3* ($1,94 \pm 1,28$ -fach) und *Pla2g4a* ($1,66 \pm 0,43$ -fach) nahmen ebenfalls leicht zu, jedoch nicht signifikant. Ein Vergleich beider TCDD-behandelter Genotypen zeigt, dass die Expression der Gene *Afp*, *E2f3* und *Pla2g4a* in AhR-Knockout-Mäusen signifikant höher war als in AhR-Wildtyp-Mäusen.

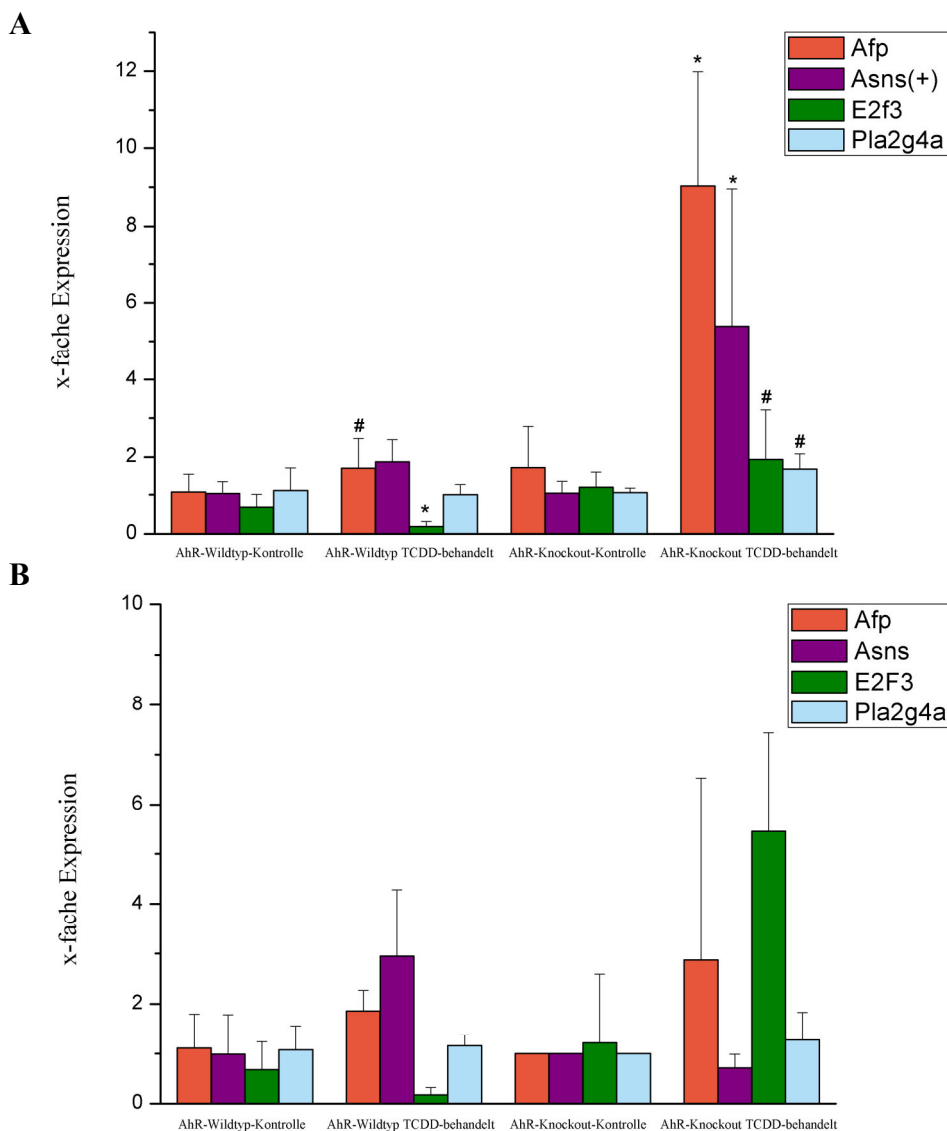


Abbildung 80: Expression (RT-PCR) der mit c-Myc in Verbindung stehenden Gene in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; (+) = Daten gemessen im Rahmen einer Diplomarbeit (Vath, 2013); $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$, ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

In Abbildung **80B** ist die Expression der Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Lebern **männlicher** Mäuse dargestellt. Ein Vergleich zwischen TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Weibchen und TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Männchen zeigt ähnliche Ergebnisse. In weiblichen und männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen nahm die Expression von *Afp* und *Asns* leicht zu. Die Expression der Gene *Pla2g4a* veränderte sich durch Behandlung der Mäuse mit TCDD kaum. Dies war sowohl in weiblichen wie auch in männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Die Genexpression von *E2f3* nahm in männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen leicht, in weiblichen signifikant ab. Ein Vergleich von TCDD-behandelten AhR-Knockout-Weibchen mit TCDD-behandelten AhR-Knockout-Männchen zeigt, dass die Genexpression der Gene *Afp* und *E2f3* in beiden Geschlechtern erhöht war. Wobei die Expression von *E2f3* in behandelten männlichen AhR-Knockout-Mäusen stärker zunahm als in behandelten weiblichen AhR-Knockout-Mäusen. Bei *Asns* war es hingegen umgekehrt. Hier war die Expression in weiblichen, TCDD-behandelten Mäusen höher als in männlichen, TCDD-behandelten Mäusen. Die *Pla2g4a*-Expression in weiblichen und männlichen AhR-Knockout-Mäusen nahm durch TCDD nur minimal zu.

In Tabelle **69** sind die Ergebnisse des Microarrays für die Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Lebern (Lohr, 2013) und Nieren weiblicher TCDD-behandelter Mäuse zusammengefasst.

Tabelle 69: Microarray-Daten für die Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Lebern (Lohr, 2013) und Nieren TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt
	AhR ^{+/+}	AhR ^{-/-}	AhR ^{+/+}	AhR ^{-/-}
	Leber		Niere	
<i>Afp</i>	0,33	3,36	0,24	0,43
<i>Asns</i>	0,79	2,42	0,17	-1,09
<i>E2f3</i>	-0,3	1,12	-0,13	0,31
<i>Pla2g4a</i>	0,18	1,23	0,09	0,2

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der RT-PCR weiblicher Mäuse und des Microarrays lassen sich zum Teil ähnliche Resultate erkennen. Die Expression des Gens *E2f3* nahm in den Lebern weiblicher, TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse signifikant ab. Dies war, wenn auch nicht signifikant, auch in den Microarray Daten zu beobachten (Lohr, 2013). Die Expression der Gene *Afp*, *Asns* und *Pla2g4a* stiegen leicht an bzw. verändern sich kaum in der RT-PCR. Dies war in den Ergebnissen des Microarrays ebenfalls zu sehen.

Die Microarray-Daten zeigen, dass die Expression der vier Gene in den Lebern behandelte weiblicher AhR-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle signifikant zunahm (Lohr, 2013). Die Genexpressionsdaten aus der RT-PCR der weiblichen Mäuse bestätigten, dass die

Expression der vier Gene in den Lebern durch Behandlung von weiblichen AhR-Knockout-Mäusen mit TCDD gesteigert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulierung der Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* AhR-unabhängig erfolgt. Da belegt werden kann, dass c-Myc-Proteine die Gentranskription von *Afp* durch Bindung an die AfP/HRE-Sequenz aktivieren (Mazure *et al.*, 2002) und in humanen Hepatomzellen durch Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden gegen *c-Myc*-mRNA die *Afp*-Genexpression vermindert wurde (Ebinuma *et al.*, 1999), kann dies als Indiz für eine mögliche Regulierung durch den Transkriptionsfaktor c-Myc bewertet werden. O’Connell *et al.* (2003) konnten in einer Microarray-Analyse zeigen, dass die Expression von *Asns* durch c-Myc reguliert wird. Adams *et al.* 2000 konnten beweisen, dass der *E2f3a*-Promotor mehrere c-Myc-Bindungsstellen besitzt und dass in transfizierten REF52-Zellen (embryonale Ratten-Fibroblasten) der *E2f3a*-Promotor durch Bindung von c-Myc aktiviert wurde.

Dagegen spricht, dass in einer Studie von Kang *et al.* (2005) in HepG2-Zellen TCDD dosisabhängig die *Afp*-Expression induzierte. In einer weiteren Studie von Kinehara *et al.* (2009) konnte an Hepa-1c1c7-Zellen eine erhöhte *Pla2g4a*-Expression nach der Behandlung mit TCDD beobachtet werden. Eine TCDD-vermittelte Induktion von *Pla2g4a* konnte in AhR-defizienten c12-Maushepatomzellen nicht beobachtet werden. Kinehara *et al.* vermutete eine AhR-abhängige Regulierung der *Pla2g4a*-Expression (Kinehara *et al.*, 2009). Boverhof *et al.* (2006) zeigten, dass der *Asns*-Promotor drei DRE-Sequenzen zur Bindung des AhR besitzt. Dies würde eher auf eine AhR-abhängige Regulierung von *Afp*, *Asns* und *Pla2g4a* hindeuten.

Die Auswertung der eigenen Ergebnisse lässt vermuten, dass die Regulierung der Expression von *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* AhR-unabhängig abläuft, da nur in den Lebern behandelter AhR-Knockout-Mäuse die Expression erhöht war. Auch ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass die Expression von *Afp* und *Asns* AhR-unabhängig über c-Myc reguliert wird (Mazure *et al.*, 2002; Mazure *et al.*, 2002; O’Connell *et al.*, 2003). Keine eindeutige Aussage lässt sich zur Regulierung der Genes *Pla2g4a* machen in wie weit die Regulierung Ahr-abhängig oder – unabhängig über den Transkriptionsfaktor c-Myc verläuft. In weiteren Experimenten müsste die Regulierung dieser Gene mit Hilfe von AhR/c-Myc-Knockout-Mäusen oder *in vitro* mittels siRNA gegen AhR und c-Myc weiter erforscht werden.

Ein Vergleich der Microarray-Ergebnisse der Lebern (Lohr, 2013) mit den der Nieren (Tabelle 69) zeigt, dass in den Nieren die vier Gene sowohl in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen wie auch in behandelten AhR-Knockout-Mäusen eine verminderte bzw. kaum veränderte Expression aufwiesen. Ähnliches ließen auch die Ergebnisse der RT-PCR in den Nieren weiblicher Mäuse erkennen. In den Lebern hingegen nahm die Genexpression in AhR-Knockout-Mäusen durch Behandlung mit TCDD signifikant zu.

Abbildung 81A zeigt die Expression der Gene *Afp* und *Asns* in den Nieren weiblicher Mäuse. Durch Behandlung der AhR-Wildtyp-Mäuse mit TCDD kam es zu einer leichten, aber nicht

signifikanten, Abnahme der Genexpression von *Afp*. Die Genexpression von *Asns* wurde durch TCDD nicht verändert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten TCDD-behandelte AhR-Knockout-Mäuse bei *Asns* eine statistisch hochsignifikant Abnahme der Expression und bei *Afp* nur eine geringe Abnahme. Ein Vergleich der beiden behandelten Genotypen zeigt, dass die Genexpression von *Asns* statistisch signifikant höher in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen war als in behandelten AhR-Knockout-Mäusen.

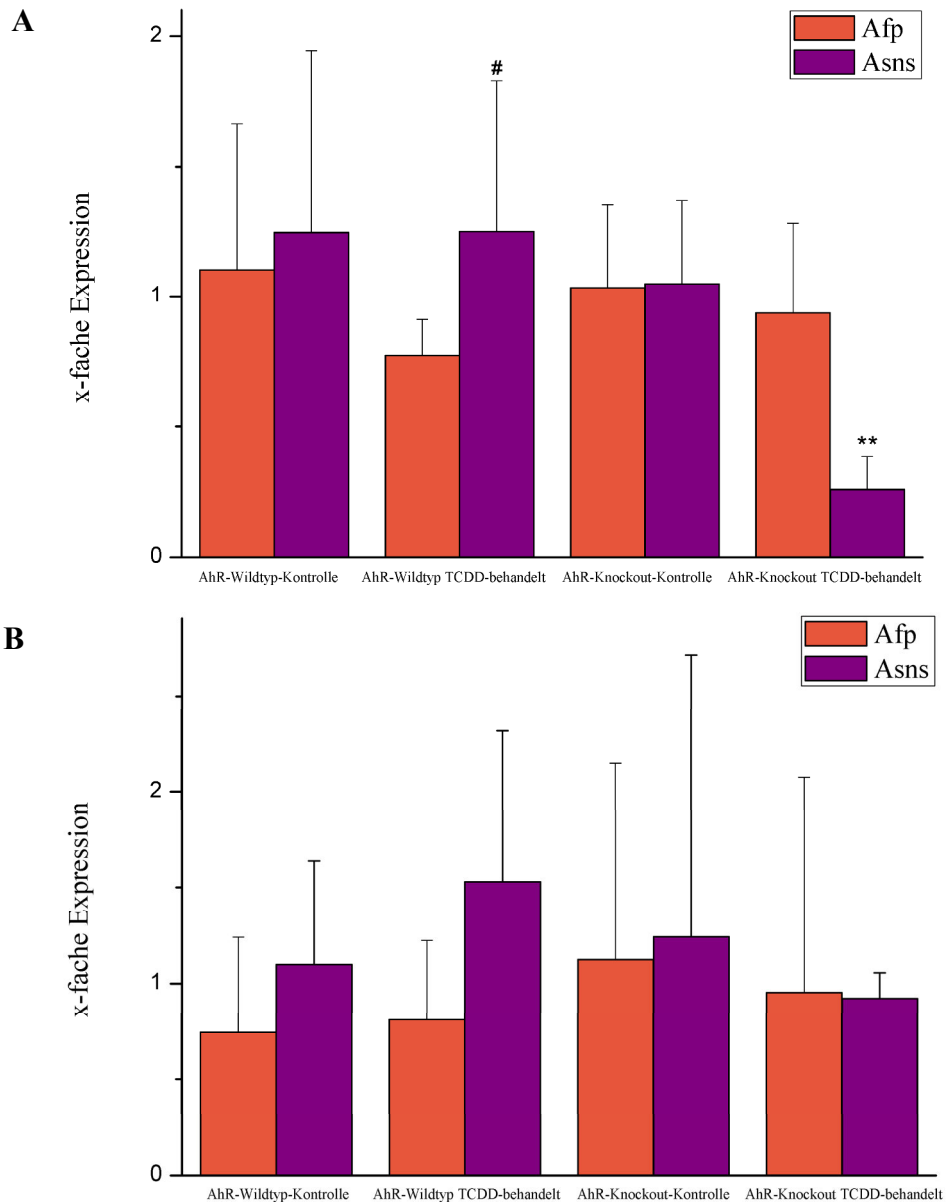


Abbildung 81: Expression (RT-PCR) der mit c-Myc in Verbindung stehenden Gene in den Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

In Abbildung **81B** ist die Genexpression von *Afp* und *Asns* in den Nieren **männlicher** Mäuse dargestellt. Der Vergleich zwischen behandelten weiblichen und männlichen Tieren zeigt ähnliche Resultate. In weiblichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen veränderte sich die *Asns*-Expression durch die TCDD-Behandlung nicht, während in behandelten männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen die Expression leicht zunahm. Die *Afp*-Genexpression nahm in weiblichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle leicht ab, während sie sich in männlichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen kaum veränderte. Der Vergleich zwischen behandelten weiblichen und männlichen AhR-Knockout-Mäusen zeigt, dass in den Weibchen die Expression von *Asns* durch die TCDD-Behandlung hochsignifikant abnahm, während sie sich in den Männchen kaum veränderte. Die *Afp*-Expression blieb durch Behandlung mit TCDD in AhR^{-/-}-Mäusen beider Geschlechter unverändert.

Die Daten von Microarray und RT-PCR zeigen, dass die Expression von *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* durch TCDD in den Nieren von weiblichen AhR-Knockout-Mäusen herunterreguliert bzw. kaum reguliert wurden. Da in den Nieren TCDD-behandelter weiblicher AhR-Knockout-Mäuse *c-Myc* ebenfalls herunterreguliert war, würde dies für eine Regulierung der Gene *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* durch den Transkriptionsfaktor c-Myc sprechen.

4.7.7 Genexpression von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in Leber und Niere

Wie im Microarray der Nieren (Kapitel 4.6.2) zu sehen ist zählte *Cyp24a1* zu den am stärksten hochregulierten Genen in den Nieren weiblicher TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse. *Cyp24a1* codiert das Enzym 25-Hydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase, das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) zu Calcitetrol metabolisiert. Hauptaufgabe von Calcitriol liegt in der Homöostase des Calcium- und Phosphorhaushaltes. Außerdem ist bekannt, dass Calcitriol und seine Analoga in der Lage sind, die Proliferation einiger Krebszellen zu inhibieren. Die Überexpression des Gens *Cyp24a1* konnte in verschiedenen humanen Tumoren wie z. B. in Lunge, Niere und Dickdarm beobachtet werden. Es wird als Biomarker für eine ungünstige Krebs-Prognose angesehen. Eine erhöhte Metabolisierung von Calcitriol bei der Tumorentstehung könnte, wegen des dadurch unterdrückten wachstumregulierenden Effektes, das Tumorstadium weiter begünstigen. Calcitriol wird auch ein positiver Einfluss auf die Zelldifferenzierung, Angiogenese und Apoptose zugeschrieben (Anderson *et al.*, 2006; Höbaus *et al.*, 2013; Urbschat *et al.*, 2013). Calcitriol wird in den Nieren durch das Enzym 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase aus dem Prohormon 25-Hydroxyvitamin D₃ gebildet, Codiert wird die 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase durch das Gen *Cyp27b1*. Sowohl *Cyp24a1* als auch *Cyp27b1* werden über den Vitamin D-Rezeptor (VDR) reguliert (Dusso *et al.*, 2005). Eine erhöhte Expression der Gene

Cyp24a1 und *Cyp27b1* konnte in den Nieren von Patienten mit Klarzellkarzinomen beobachtet werden, was auf eine Störung des Vitamin D-Metabolismus hindeutet (Urbschat *et al.*, 2013). Die Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* wiesen in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse eine erhöhte Expression auf, welche in Tabelle 70 zusammengefasst sind. In weiteren Untersuchungen wurde die Genexpression von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in Leber und Niere weiblicher und männlicher Mäuse mittels RT-PCR weitergehend überprüft.

Tabelle 70:: Microarray-Daten für die Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Lebern (Lohr, 2013) und Nieren weiblicher TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$

Gen	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt	TCDD-behandelt
	AhR ^{+/+}	AhR ^{-/-}	AhR ^{+/+}	AhR ^{-/-}
	Leber		Niere	
<i>Cyp24a1</i>	0,34	0,01	-0,61	4.57
<i>Cyp27b1</i>	0,44	-1,01	0,9 ±	0.62
<i>VDR</i>	-0,57	-1,75	-0,22	0.36

Abbildung 82A zeigt die Expression der Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in Leber und Niere weiblicher Mäuse. Die Genexpression von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Lebern von AhR-Wildtyp-Mäusen veränderte sich durch Behandlung mit TCDD kaum bzw. nahm minimal ab. Dies war in den Lebern von TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen ebenfalls zu beobachten. In den Nieren weiblicher TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse veränderte sich die Genexpression von *Cyp24a1* und *VDR* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur geringfügig. Dagegen nahm die Expression von *Cyp27b1* leicht, allerdings nicht signifikant auf $2,76 \pm 1,51$ -fach zu. In den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse nahm die Expression von *Cyp24a1* ($15 \pm 6,53$ -fach), *Cyp27b1* ($2,4 \pm 0,83$ -fach) und von *VDR* ($1,77 \pm 0,39$ -fach) im Vergleich zur Kontrolle hingegen statistisch signifikant zu. Ein Vergleich der Genotypen zeigt, dass die Expression von *Cyp27b1* und *Cyp24a1* in den Lebern behandelter AhR-defizienter-Mäuse statistisch signifikant höher war als in den Lebern behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse. Ebenfalls statistisch signifikant erhöht war die *VDR*- und *Cyp24a1*-Genexpression in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse im Vergleich zu den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse. Ein Vergleich zwischen Leber und Niere zeigt, dass in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse die Genexpression von *Cyp24a1* signifikant höher war als in den Lebern behandelter AhR-defizienter-Mäuse. Die *VDR*-Genexpression war in Leber und Niere behandelter AhR-defizienter-Tiere auf einem vergleichbaren Niveau, während die *Cyp27b1*-Expression in den Nieren im Vergleich zu den Lebern leicht, aber nicht signifikant erhöht war.

Ein Vergleich der Microarray-Daten (Tabelle 70) mit den Ergebnissen der RT-PCR der weiblichen Tiere zeigt ähnliche Resultate. Die Daten der RT-PCR zeigen, dass die Expression

der Gene *Cyp24a1* und *Cyp27b1* in den Lebern von weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle durch Behandlung mit TCDD leicht abnahm. Die *VDR*-Expression veränderte sich kaum. Dagegen nahm die Expression der Gene *Cyp24a1* und *Cyp27b1* im Microarray leicht zu und die *VDR*-Expression leicht ab (Lohr, 2013).

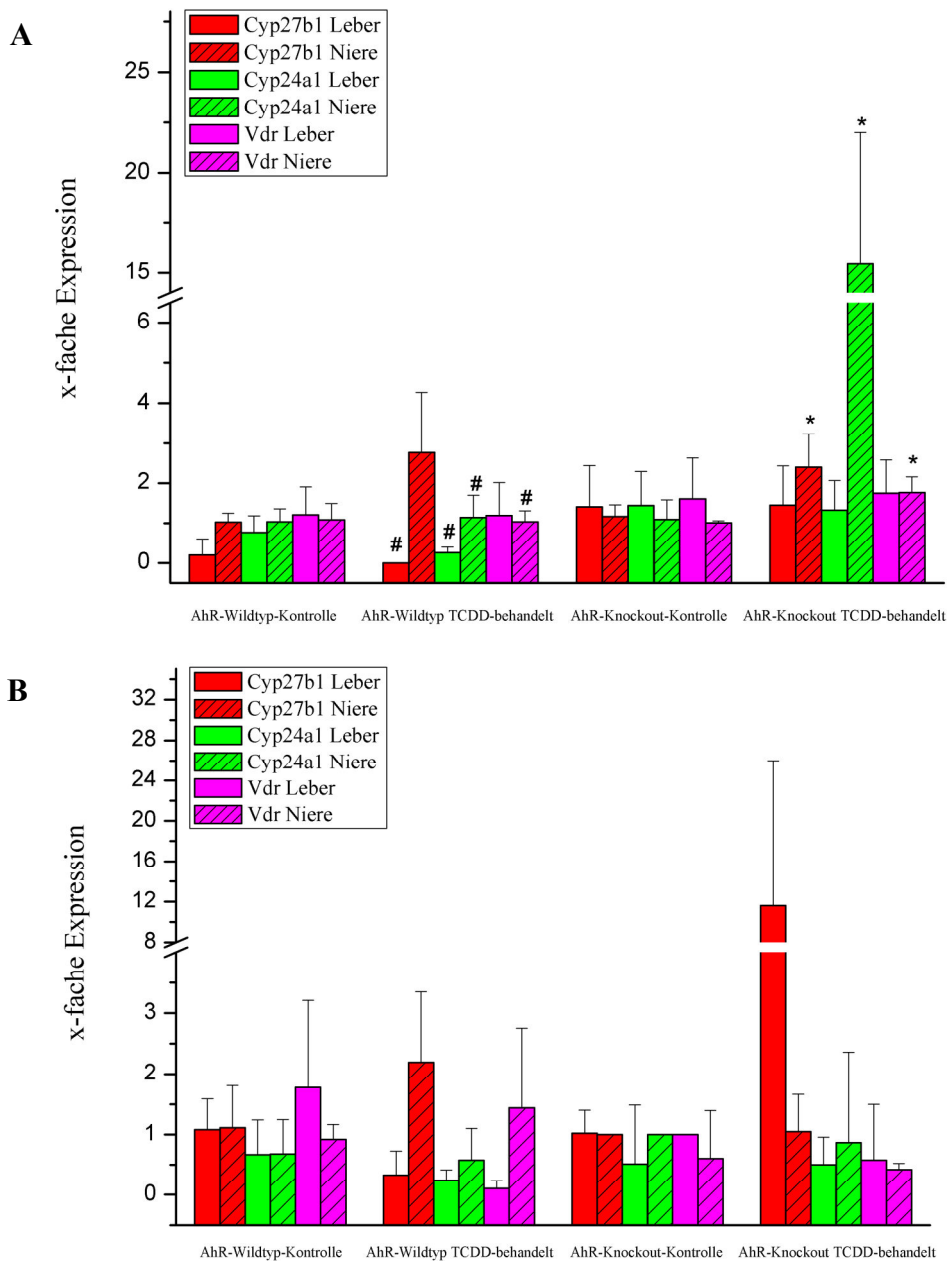


Abbildung 82: Genexpression (RT-PCR) von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Lebern und Nieren A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt); + = $p < 0,05$ (AhR-Knockout TCDD-behandelt Leber vs. Niere)

Im Microarray war zu sehen, dass in den Lebern TCDD-behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse die Genexpression von *Cyp27b1* und *VDR* signifikant abnahm und die *Cyp24a1*-Expression sich kaum veränderte (Lohr, 2013). Dies war in der RT-PCR nicht der Fall, hier veränderte sich die Expression der drei Gene nur geringfügig.

In den Nieren TCDD-behandelter weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse war die Expression von *Cyp27b1* sowohl im Microarray als auch in der RT-PCR leicht erhöht. Die Expression von *VDR* und *Cyp24a1* nahm im Microarray leicht ab, in der RT-PCR veränderte sich die Expression kaum. Die Daten des Microarray zeigten eine erhöhte Expression aller drei Gene in den Nieren der AhR-defizienten-Mäuse, wobei nur die Expression von *Cyp24a1* signifikant war. Ähnliches ist in den Ergebnissen der Rt-PCR zu sehen. Die Expression der drei Gene nahmen im Vergleich zur Kontrolle allerdings statistisch signifikant zu.

Abbildung **82B** zeigt die Genexpressionsdaten von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in Leber und Niere **männlicher** Mäuse. Ein Vergleich männlicher TCDD-behandelter Mäuse mit weiblichen TCDD-behandelten Mäusen zeigt, dass die Expression der Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* in den Lebern sowohl in weiblichen wie auch in männlichen TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen leicht abnahm. Während die *VDR*-Expression in den Lebern männlicher, behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse abnahm, blieb sie in den Lebern weiblicher behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse unverändert. Ein Vergleich zwischen weiblichen und männlichen behandelten AhR-defizienter-Mäusen zeigt, dass sich die Expression der drei Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Lebern weiblicher AhR-defizienter-Mäuse durch die TCDD-Behandlung kaum veränderte, während in Männchen die Expression von *Cyp27b1* anstieg und die Expression von *Cyp24a1* und *VDR* unverändert blieb bzw. leicht abnahm.

In den Nieren behandelte weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse nahm die Expression von *Cyp27b1* leicht zu und die von *VDR* und *Cyp24a1* veränderte sich kaum. In männlichen Mäusen war ähnliches zu beobachten Die Expression von *Cyp27b1* nahm ebenfalls leicht zu, ebenso die *VDR*-Expression. Die Genexpression von *Cyp24a1* veränderte sich kaum. Während in den Nieren behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse die Expression der drei Gene statistisch signifikant zunahm, veränderte sich die Expression der drei Gene in den Nieren behandelte männlicher AhR-defizienter-Mäuse kaum bzw. nahm minimal ab.

Die Ergebnisse des Microarrays sowie der RT-PCR deuten darauf hin, dass die Induktion von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Nieren weiblicher AhR-defizienter-Mäuse AhR-unabhängig abläuft, da nur in TCDD-behandelten weiblichen AhR-defizienten-Mäusen eine signifikant erhöhte Expression von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* beobachtet wurde. Matsunawa *et al.* (2009) berichteten dagegen über eine Steigerung der durch $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D₃ (10 nM) induzierten *CYP24A1*-Expression durch Applikation TCDD (1 nM) in humanen THP-1 Zellen. Dieser synergistische Effekt auf die *CYP24A1*-Expression wurde in dieser Studie auch in Ko-Inkubationsversuchen mit Benzo[*a*]pyren (BaP, 1 µM) und Calcitriol (3 nM) beobachtet. In der Studie wurde gezeigt, dass der durch BaP bzw. TCDD-induzierte

verstärkende Effekt auf die *CYP24A1*-Expression durch Aktivierung des AhR vermittelt wurde. In humanen HEK293-Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Matsunawa et al., 2009).

Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete erhöhte *Cyp24a1*-Expression in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse deutet daher eher auf einen synergistischen Effekt von TCDD und Calcitriol hin, als auf einen alleinigen Effekt von TCDD. Da mindestens eine Calcitriol-Konzentration von 10 nM für einen signifikanten synergistischen Effekt auf die *CYP24A1*-Expression benötigt wurde (Matsunawa et al., 2009) und in den Nieren von unbehandelten Wildtyp-Mäusen, laut einer Studie von Chow *et al.*, eine basale Konzentration von $70,5 \pm 10,4$ pM Calcitriol gefunden wurde (Chow *et al.*, 2013), könnte man vermuten, dass die erhöhte Expression von *Cyp24a1* in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse allein auf die Wirkung von TCDD zurückzuführen ist.

Des Weiteren konnte eine Induktion von *Cyp24a1* in murinen myeloiden Zellen nach Behandlung mit TCDD (10 nM) festgestellt werden. Einen verstärkenden Effekt von TCDD auf die Calcitriol-induzierte *Cyp24a1*-Expression konnte bei Ko-Inkubationsversuchen nicht beobachtet werden und somit konnte ein synergistischer Effekt ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Ergebnisse, Dissertation Messer 2014). Gegen eine Calcitriol-vermittelte Induktion von *Cyp24a1* spricht ebenfalls, dass erste signifikante Effekte auf die Expression von *CYP24A1* ab einer Calcitriol-Konzentration von 1 nM auftraten (Matsunawa et al., 2009). Diese Konzentration liegt über der gefunden basalen Calcitriol-Konzentration in den Nieren von unbehandelten Wildtyp-Mäusen (Chow *et al.*, 2013).

Auch die erhöhte Expression von *Cyp27b1* und *VDR* in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse spricht gegen eine Calcitriol-Wirkung, da Lechner *et al.* (2007) in drei unterschiedlichen Darmkrebszelllinien (Caco-2, COGA-1 und COGA-13) zeigen konnte, dass Calcitriol (10 nM) die Expression von *CYP27B1* und *VDR* im Vergleich zur Kontrolle verminderte.

Aus der TCDD-induzierten erhöhten Expression von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse könnte man schließen, dass der VDR aktiviert wurde und die Induktion dieser Gene bewirkte. Möglicherweise wird der VDR durch Bindung von TCDD aktiviert, was aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen TCDD und Vitamin D eher unwahrscheinlich ist oder es besteht ein Cross-Talk zwischen AhR und VDR. Ein möglicher Cross-Talk zwischen AhR und VDR wurde auch schon in anderen Veröffentlichungen diskutiert (Matsunawa *et al.*, 2012, 2009; Reisz-Porszasz *et al.*, 1993). Eine weitere Möglichkeit für die Aktivierung des VDR wäre ein Cross-Talk zwischen AhR und RXR, dem Dimerisierungspartner des VDR. In der Literatur sind einige Hinweise auf eine Interaktion zwischen AhR und RXR zu finden (Murphy *et al.*, 2007; Nilsson und Håkansson, 2002).

Um die Aktivierung des VDR in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse zu bestätigen müssten weitere Untersuchungen bezüglich **i**) einer möglichen Bindung von TCDD an VDR z. B. durch einen Luciferase-Reportergen-Assay sowie **ii**) eines möglichen Cross-

Talks zwischen AhR und VDR bzw. Ahr und RXR mittels Gel-Shift-Assay durchgeführt werden.

4.7.8 Genexpression verschiedener Zytokine in Leber und Milz

Zytokine sind kleine Proteine, die von einigen Zellen sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen sekretiert werden. Sie binden an spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Zielzellen und induzieren intrazelluläre Signalkaskaden, die bestimmte Zellfunktionen wie z.B. Proliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose verändern. Daneben gelten Zytokine als Schlüsselfaktoren in der Vermittlung des *acute phase response* nach einer Gewebsverletzung oder Infektion. Chronische Leberentzündungen, hervorgerufen durch dauerhafte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, führt zur Entwicklung einer Leberfibrose und letztendlich zu einer Leberzirrhose (Ramadori und Armbrust 2001). In einer Studie von Pierre *et al.* konnte TCDD als Auslöser einer Leberfibrose ermittelt werden (Pierre *et al.*, 2014). Unveröffentlichte Ergebnisse einer Microarray-Analyse der Milzen (Arbeitsgruppen-interne Studie, Seibel, 2013) zeigten eine erhöhte Genexpression der Zytokine *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* in TCDD-behandelten AhR-defizienten Mäusen. Daher wurde nun die Expression der Gene *IL-1 α* (Interleukin), *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* (Tumornekrosefaktor α) in Leber und Milz weiblicher und männlicher Mäuse mittels RT-PCR überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst

4.7.8.1 Leber

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine Leberzellschädigung in den meisten Fällen nicht auf das schädigende Agens selbst sondern auf Entzündungszellen, die durch gestresste Hepatozyten aktiviert werden, zurückzuführen ist. Hepatotoxine verursachen möglicherweise in Hepatozyten eine Stresssituation, die eine Sekretion von Chemokinen gefolgt von einer Ansammlung von Entzündungszellen bewirken und die schlussendlich zu einer Leberzellschädigung führen. Hepatozellulärer Stress aktiviert die in der Leber vorhandenen Makrophagen wie z. B. Kupfferzellen, die pro-inflammatorische Zytokine wie *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α* sekretieren (Ramadori und Armbrust 2001).

Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird unter anderem von Dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen, T_H1- und T_H2-Zellen sekretiert (Pestka *et al.*, 2004). IL-6 kann sowohl als pro-inflammatorisches Zytokin als auch als anti-inflammatorisches Myokin agieren (Heinrich *et al.* 2003, Pedersen und Febbraio 2008).

Die Genexpression der Zytokine *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* wurde in den Lebern weiblicher und männlicher Mäuse mittels RT-PCR untersucht. In Abbildung 83A ist die Genexpression dieser fünf Zytokine in den Lebern **weiblicher** Mäuse dargestellt.

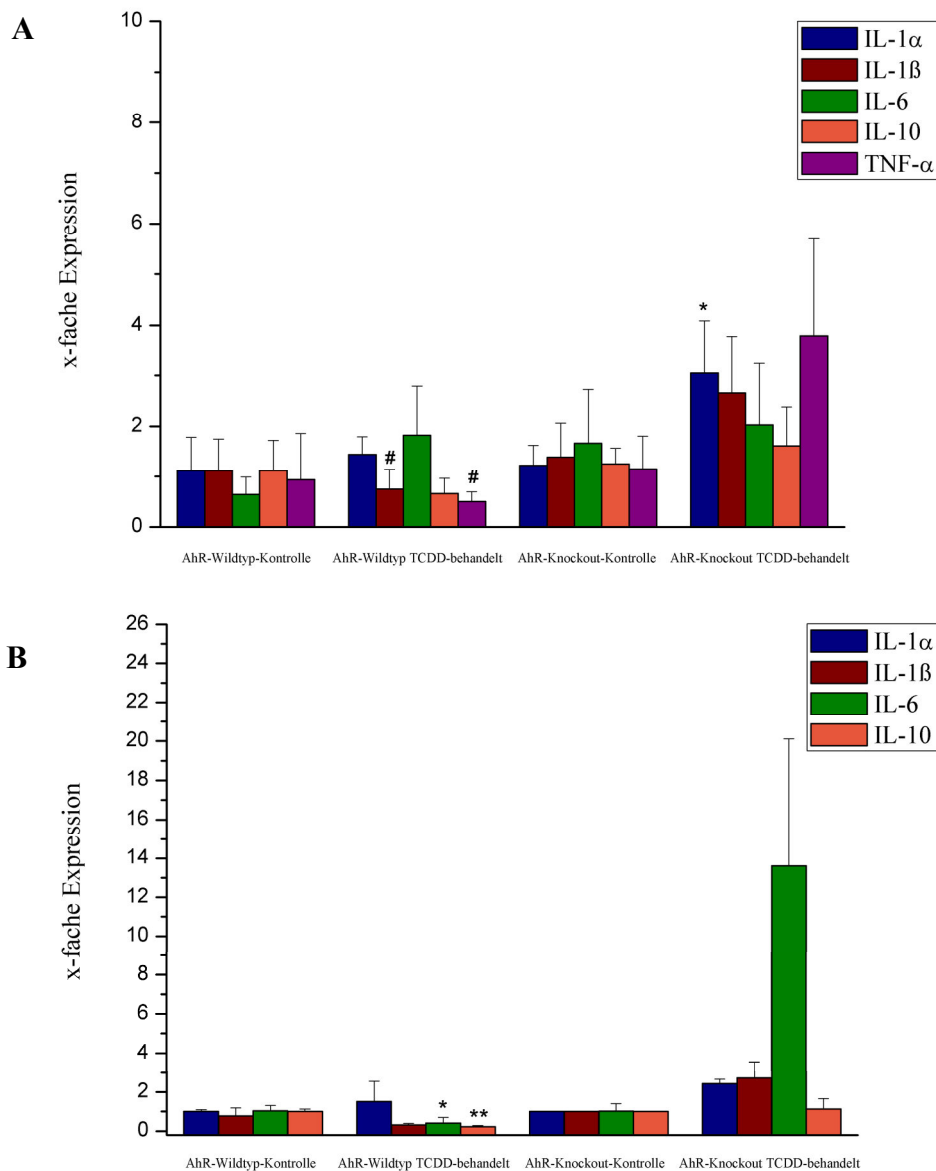


Abbildung 83: Expression (RT-PCR) verschiedener Zytokine in den Lebern A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

Durch Behandlung von AhR-Wildtyp-Mäusen mit TCDD kam es zu einer leichten Zunahme der Genexpression von *IL-1 α* und *IL-6*. Dagegen nahm die Expression der Gene *IL-1 β* , *IL-10*, und *TNF- α* leicht ab. In einer Studie von Pierre *et al.* (2014) führte TCDD (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG pro

Woche) nach zweiwöchiger Behandlung männlicher AhR-Wildtyp-Mäuse zu einer extrem signifikanten Induktion von *IL-1 β* und *TNF- α* in den Lebern. In AhR-Knockout-Mäusen konnten Pierre *et al.* dies nicht beobachten, allerdings wurde hier ein anderes Knockout Modell (Austausch Exon 1) verwendet (Pierre *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie wurde ein signifikant erhöhtes IL-6 Serumlevel in TCDD-behandelten (15 mg/kg KG) Mäusen nach 24 h und 48 h beobachtet (Kim *et al.*, 2003). Dies weist auf das Potential von TCDD hin AhR-abhängig eine Leberschädigung zu induzieren. In AhR-Knockout-Mäusen führte TCDD zu einer leichten Erhöhung der Expression der Gene *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* . Die *IL-1 α* -Expression nahm gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant zu. Ein Vergleich beider behandelten weiblichen Genotypen zeigt, dass die Expression der Gene *IL-1 β* und *TNF- α* in weiblichen AhR-Knockout-Mäusen statistisch signifikant höher war als in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen des Microarrays gestaltet sich schwierig, da die Expressionswerte für die Gene *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-10* und *TNF- α* aufgrund der *Cut-Off*-Kriterien (Signalintensität (A) ≥ 7 , p-Wert $\leq 0,05$, $\log_2 fc \geq 1$ oder ≤ -1) aus der Auswertung herausfallen. In Tabelle 71 sind die Expressionswerte aus den Microarray-Daten aufgeführt (Lohr, 2013). Die Daten des Microarray können wegen der niedrigen Signalintensität nur als Tendenz angesehen werden.

Tabelle 71: Microarray-Daten für die Gene *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-10* und *TNF- α* in den Lebern weiblicher AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$ (Lohr, 2013)

Gen	Signalintensität (A)	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>IL-1α</i>	5,13	0,35	-0,25
<i>IL-1β</i>	6,63	0,064	0,69
<i>IL-6</i>	5,32	0,20	0,022
<i>IL-10</i>	5,46	0,05	0,04
<i>TNF-α</i>	5,39	0,59	-0,41

Im Microarray ist zu erkennen, dass die Expression der fünf Gene in TCDD-behandelten weiblichen AhR-Wildtyp Mäusen nur minimal bzw. kaum ansteigt (Lohr, 2013). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte auch die RT-PCR. Hier stieg die Expression der Gene *IL-1 α* und *IL-6* minimal an. Die Expression der Gene *IL-1 β* , *IL-10* und *TNF- α* nahm hingegen leicht ab. In TCDD-behandelten weiblichen AhR-Knockout-Mäusen nahm die Genexpression von *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-10* im Microarray minimal zu, während die Expression der Gene *IL-1 α* und *TNF- α* minimal abnahm. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen zum Teil gegensätzliche Resultate. Die Expression der fünf Gene nahm in weiblichen behandelten AhR-Knockout-Mäusen leicht zu.

Abbildung 83B zeigt die Expression der Gene *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-10* in den Lebern **männlicher** Mäuse. Ein Vergleich behandelte männliche und weibliche AhR-Wildtyp-

Mäuse zeigt, dass die *IL-1 β* -Genexpression sowohl in männlichen wie auch in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen durch TCDD abnahm, während die *IL-1 α* -Expression in beiden Geschlechtern leicht zunahm. Die Expression von *IL-6* stieg in weiblichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen leicht an, in männlichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen hingegen signifikant an. Die *IL-10*-Genexpression nahm in weiblichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen leicht, in männlichen behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen hochsignifikant zu.

In weiblichen TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäusen war eine Steigerung der Expression der Gene *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* zu beobachten. In männlichen behandelten AhR-Knockout-Mäusen dagegen stieg die Expression der Gene *IL-1 α* und *IL-1 β* leicht an, während die *IL-6*-Expression stärker anstieg und die *IL-10*-Expression sich kaum veränderte.

Ein Vergleich der eigenen Daten mit denen der Literatur lässt keine eindeutige Aussage zu, inwieweit TCDD AhR-unabhängig die leichte Induktion der Zytokine *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* in den Lebern AhR-defizienter Mäuse bewirkte.

4.7.8.2 Milz

In Abbildung 84 ist die Expression der Gene *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* in den Milzen weiblicher Mäuse dargestellt. Durch Behandlung weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse kam es zu einer leichten Abnahme der Expression der Gene *IL-1 β* und *IL-10*. Eine signifikante Abnahme der *TNF- α* -Expression war zu beobachten, während die Genexpression von *IL-6* und *IL-1 α* minimal zunahm. In einer Studie von Chen *et al.*(2013) an Mäusen wurde vergleichbares beobachtet. Die Bildung von *IL-10* in den Milzen wurde durch Behandlung mit TCDD unterdrückt. Zytun *et al.* (2002) konnten dagegen an weiblichen C57BL/6-Mäusen zeigen, dass die Expression der Zytokine *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* und *TNF- α* drei Tage nach Behandlung mit TCDD (50 μ g/kg KG) erhöht war.

In den eigenen Untersuchungen war in TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen eine statistisch signifikante Zunahme der Expression der Gene *IL-1 β* und *IL-10* zu beobachten. Dahingegen nahm die Genexpression von *IL-1 α* und *IL-6* gegenüber der Kontrolle leicht ab, während die *TNF- α* Genexpression unverändert blieb. Ein Vergleich beider behandelten Genotypen zeigte, dass die Expression der Gene *IL-1 β* , *IL-10* und *TNF- α* in TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen signifikant höher war als in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen. Eine hochsignifikant erhöhte Expression des Genes *IL-1 α* war in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu behandelten AhR-Knockout-Mäusen zu beobachten.

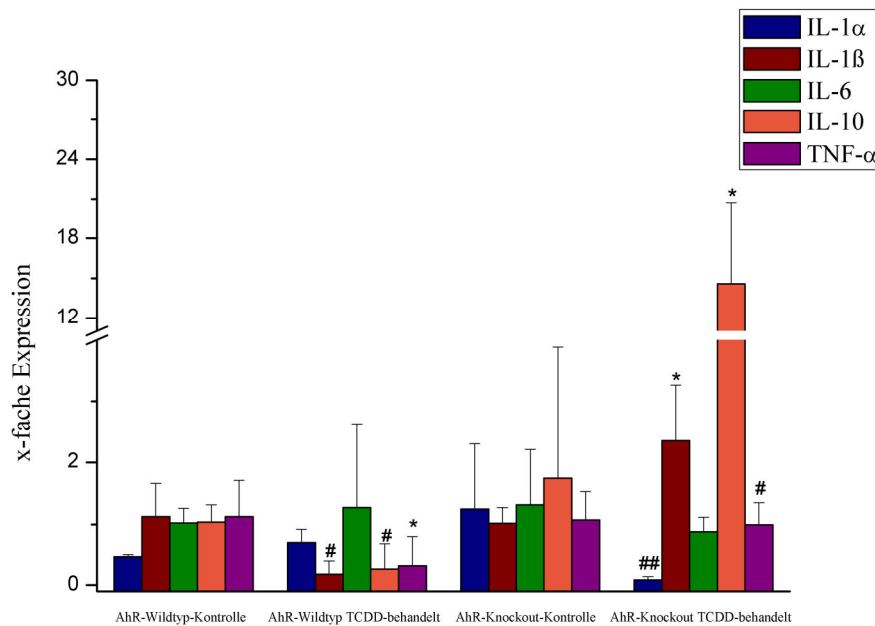


Abbildung 84: Expression verschiedener Cytokine in den Milzen der weiblichen Mäuse; $3 \leq n \leq 4$; Mittelwert + Standardabweichung; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Correction; * = $p \leq 0,05$ (Kontroll-Tier vs. TCDD-behandeltes Tier); # = $p \leq 0,05$, ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

Auf eine Abbildung der Daten männlicher Mäuse wurde verzichtet, da, wie in der Einleitung von Kapitel 4.7.1.4 bereits vermerkt wurde, nur ein Stichprobenumfang von eins für die RT-PCR Messung zur Verfügung stand.

Die Daten deuten auf eine AhR-unabhängige Regulierung der Expression der Zytokine *IL-1β* und *IL-10* hin. Die in der Studie Zeytun *et al.* (2002) beobachtete erhöhte Expression von *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10* und *TNF-α* in Wildtyp-Mäusen und das Vorkommen von DRE-Sequenzen im Promotor der Zytokine *IL-1β*, *IL-6* und *IL-10* deute jedoch eher auf eine AhR-abhängige Regulierung hin.

4.7.9 Genexpression von *Esm1*, *Igfbp1* und *Cdh1* in den Lebern

Wie schon in Kapitel 4.7.8 erläutert wurde, können pro-inflammatorische Zytokine in den Lebern eine akute Entzündung verursachen, welche zu einer Leberfibrose und zu Leberzellkarzinomen führen kann. Da in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse eine erhöhte Expression dieser Zytokine nachgewiesen wurde, sollten einige Gene, die im Microarray eine erhöhte Expression aufwiesen und im Zusammenhang mit Leberfibrose und Leberzellkarzinomen stehen, weitergehend mittels RT-PCR untersucht werden. Zu diesen Genen gehören *Afp*, *Esm1*, *Igfbp1*, *Lpl* und *Cdh1*. Nähere Informationen sowie die Genexpressionsdaten zu *Afp* und *Lpl* sind den Kapiteln 4.7.6.1 und 4.7.4.2 zu entnehmen. *Endothelial Cell Specific Molecule 1* (*Esm1*) gehört zur Gruppe der Proteoglykane, die eine wichtige Rolle spielen bei der Angiogenese, der Stabilisierung von Blutgefäßen sowie der

Proliferation von Endothelzellen. Außerdem soll *Esm1* für die Zelladhäsion, Entzündungsreaktion sowie für die Tumoprogession von Bedeutung sein (Abid *et al.*, 2006; Bechard *et al.*, 2000; Lassalle *et al.*, 1996; Sarrazin *et al.*, 2006). Das Gen *Igfbp1* gehört zur Familie der IGFBP, die eine hohe Affinität für IGF-I und -II besitzen und somit den Level des freien IGF reguliert (Firth und Baxter, 2002). E-Cadherin (*Cdh1*) ist eines der wichtigsten Zelladhäsionsmoleküle im Epithelgewebe und ist auf der Zelloberfläche lokalisiert. *Cdh1* beeinflusst Zellreaktionen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Ein Funktionsverlust korreliert mit dem Auftreten invasiver Tumore und Metastasenbildung (Barth *et al.*, 1997; Pećina-Slaus, 2003). In B6C3F1-Mäusen mit spontanen Leberzellkarzinomen konnte eine erhöhte Expression von *Afp* sowie *Esm1*, *Lpl*, *Igfbp1* und *Cdh1* festgestellt werden (Hoenerhoff *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013). *Afp* und *Esm1* sind Biomarker für Leberzellkarzinome und wiesen daher im Lebergewebe von HCC Patienten ebenfalls eine erhöhte Expression auf (Kang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013).

In Abbildung **85A** ist die Expression von *Esm1*, *Igfbp1* und *Cdh1* in den Lebern **weiblicher** Mäuse dargestellt. Die Expressionsdaten von *Esm1* und *Cdh1* weiblicher Mäuse sind aus der Diplomarbeit von Frau Vath (Vath, 2013) entnommen.

Durch Behandlung von Mäusen mit TCDD kam es zu einer hochsignifikanten Zunahme der Expression von *Esm1* und *Cdh1* sowie zu einer signifikanten Zunahme von *Igfbp1* in den Lebern weiblicher, AhR-defizienter-Mäuse. In AhR-Wildtyp-Mäusen nahm durch die Behandlung mit TCDD die Expression von *Esm1* und *Igfbp1* leicht zu während die *Cdh1*-Expression unverändert blieb. In einer Studie von Minami *et al.* (2008) konnte an TCDD-behandelten (35 µg/kg KG pro Tag für vier Tage) Wildtyp-Mäusen ebenfalls eine Steigerung der *Igfbp1*-Expression beobachtet werden. Bei TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen (Austausch Exon 1) war jedoch keine Erhöhung festzustellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in Kontrollmäusen die *Igfbp1*-Expression in AhR-defizienten-Mäusen höher war als in Wildtyp-Mäusen. Es wird vermutet, dass der AhR in Abwesenheit eines Liganden die Expression von *Igfbp1* unterdrückt oder einen Suppressor reguliert, der die *Igfbp1*-Expression beeinflusst (Minami *et al.*, 2008).

Bei Betrachtung der eigenen Untersuchungsergebnisse konnte dies bei Kontrollmäusen beider Genotype nicht festgestellt werden. Die *Igfbp1*-Expression in der AhR-Wildtyp-Kontrolle war etwas höher als in der AhR-Knockout-Kontrolle. Aufgrund der hohen Standardabweichung war dieser Unterschied nicht signifikant. Ein Vergleich der Genotypen zeigte einen hochsignifikanten Unterschied in der Expression von *Cdh1* und einen signifikanten in der *Esm1*-Expression.

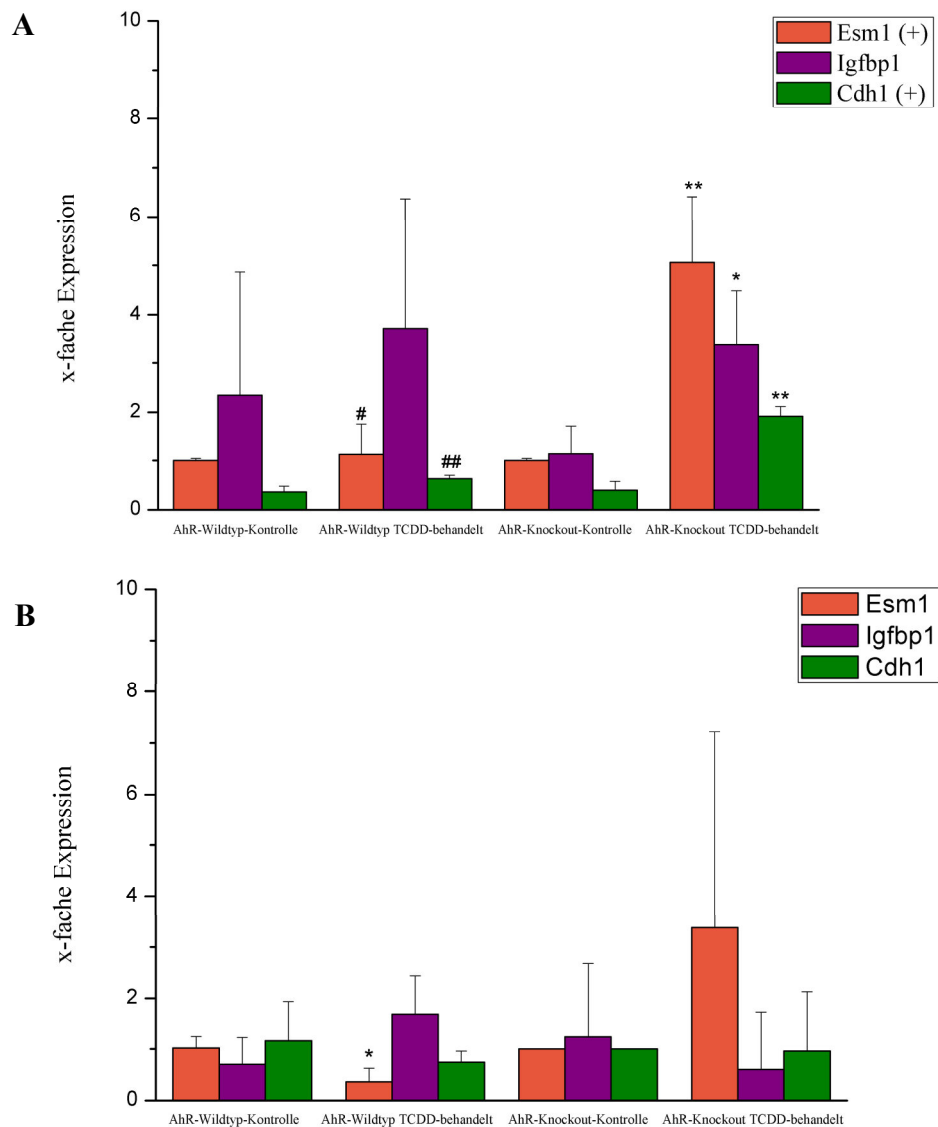


Abbildung 85: Expression der Gene *Esm1*, *Igfbp1* und *Cdh1* in Leber A) weiblicher Mäuse und B) männlicher Mäuse; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt sowie weibliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Korrektur; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt); # = $p \leq 0,05$, ## = $p \leq 0,01$ (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt)

Im Microarray (Tabelle 72) nahm die Expression der drei Gene in AhR-Knockout-Mäusen signifikant zu. In AhR-Wildtyp-Mäusen nahm *Igfbp1* und *Cdh1* signifikant zu, während *Esm1* dagegen leicht abnahm (Lohr, 2013).

Tabelle 72: Microarray-Daten für die Gene *Esm1*, *Igfbp1* und *Cdh1* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter AhR^{+/+}- und AhR^{-/-}-Mäuse; die Werte sind angegeben als $\log_2 fc$ (Lohr, 2013)

Gen	TCDD-behandelt AhR ^{+/+}	TCDD-behandelt AhR ^{-/-}
<i>Esm1</i>	-0,31	3,51
<i>Igfbp1</i>	1,23	1,72
<i>Cdh1</i>	1,12	2,31

In Abbildung **85B** ist die Expression von *Esm1*, *Igfbp1* und *Cdh1* in den Lebern **männlicher** Mäuse dargestellt. TCDD induzierte in männlichen AhR-defizienten-Mäusen *Esm1* leicht, die Expression von *Igfbp1* und *Cdh1* veränderte sich kaum. In behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen nahm die Expression von *Esm1* dagegen signifikant ab und von *Cdh1* leicht ab, während die *Igfbp1*-Expression leicht anstieg.

Ein Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Mäusen zeigt, dass in AhR-defizienten-Mäusen *Esm1* durch TCDD in beiden Geschlechtern induziert wurde. *Igfbp1* und *Cdh1* wurden nur in weiblichen Mäusen induziert. In AhR-Wildtyp-Mäusen nahm die Expression von *Igfbp1* sowohl in weiblichen als auch in männlichen Mäusen leicht zu. Während für *Cdh1* und *Esm1* in weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen ein leichter Anstieg der Expression zu beobachten war, nahm in männlichen Mäusen die Expression von *Cdh1* leicht ab, während die *Esm1*-Expression signifikant abnahm.

Die Ergebnisse der RT-PCR und des Microarrays weisen darauf hin, dass die Expression von *Esm1*, *Igfbp1* und *Cdh1* AhR-unabhängig reguliert wird. Dies steht teilweise im Widerspruch zu den in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen. In einer Studie von Boverhof *et al.* (2006) induzierte TCDD (30 µg/kg KG) AhR-vermittelt *Igfbp1* in den Lebern von Wildtyp-Mäusen. Außerdem befinden sich im *Igfbp1*-Promotor neun DRE-Sequenzen zur Bindung des AhR (Boverhof *et al.*, 2006). Möglicherweise wird die Expression von *Igfbp1* in behandelten AhR-defizienten Mäusen über das Zytokin IL-6 reguliert, da eine IL-6-vermittelte Induktion von *Igfbp1* in primären Rattenhepatozyten beobachtet werden konnte (Lelbach *et al.*, 2001).

4.8 Metabolomics

Der Begriff Metabolomics beschreibt die Analyse von Metaboliten in Gewebe oder Biofluiden. Ziel ist es dabei sämtliche kleinen Moleküle, die während des Metabolismus im Organismus entstehen, mittels analytischer Methoden zu detektieren, zu identifizieren und zu quantifizieren. Über weitere Details zum Begriff Metabolomics sowie zu den analytischen Methoden wurde bereits im Kapitel **3.4** berichtet.

Ziel des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimentes ist unter anderem die Erstellung einer AhR-Metabolomics-Plattform sowie die Identifizierung von Unterschieden im Metabolom der beiden untersuchten Genotypen (AhR-defiziente- und AhR-Wildtyp-Mäuse) nach Behandlung mit TCDD im Vergleich zur Vehikellkontrolle. Daraus sollen neue Erkenntnisse zu den Mechanismen der Toxizität von TCDD sowie zur physiologischen Rolle des AhR gewonnen werden.

Die möglichen Unterschiede zwischen AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäusen im Vollblut mit und ohne TCDD Behandlung wurden mittels HPLC-MS/MS untersucht. Für das Experiment wurden weibliche fünf – acht Monate alte AhR-Wildtyp- und AhR-defiziente-Mäuse mit oder ohne TCDD-Behandlung (25 µg/kg KG) narkotisiert und das Vollblut mit einer heparinisierten Spritze aus der *Vena cava* entnommen. Das Vollblut wurde mittels SPE-

Kartusche aufgereinigt und mit einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Nach Resuspendierung im Fließmittel der HPLC (Wasser/Methanol (95:5)) wurden die Blutextrakte in der HPLC-MS/MS vermessen. Zunächst wurde eine *full scan*-Messung durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über einen weiten Bereich der in den Proben enthaltenen Massensignale (Masse-zu-Ladung-Verhältnisse; m/z -Verhältnisse) zu erhalten (Messbereich $m/z = 50-500$). Anschließend wurden ausgewählte Massensignale mit Hilfe von *product ion scan*-Messungen weiter charakterisiert und durch *full scan*-Messungen quantifiziert. Die Versuchsdurchführung sowie die Auswertung wurden in Kapitel 3.4.7 beschrieben. Die Messungen wurden mit Vollblutproben weiblicher Mäuse mit einem Stichprobenumfang von drei durchgeführt.

4.8.1 Metabolic Fingerprinting: Vollblut

Die aufgearbeiteten Vollblutproben wurden zunächst als *full scan* in der HPLC-MS/MS vermessen. Dabei wurde zusätzlich ein HPLC-UV-Chromatogramm mit Hilfe eines UV-Detektors, bei einer Wellenlänge von 260 nm, aufgenommen. Die Messwellenlänge von 260 nm wurde ausgewählt, da bei dieser hauptsächlich aromatische Verbindungen absorbieren und die meisten AhR-Liganden aromatische, planare und hydrophobe Substanzen sind (Hankinson, 1995). In Abbildung 86 ist ein HPLC-UV-Chromatogramm einer Vollblutprobe einer weiblichen, unbehandelten AhR-Wildtyp-Maus (AhR-Wildtyp-Kontrolle) dargestellt.

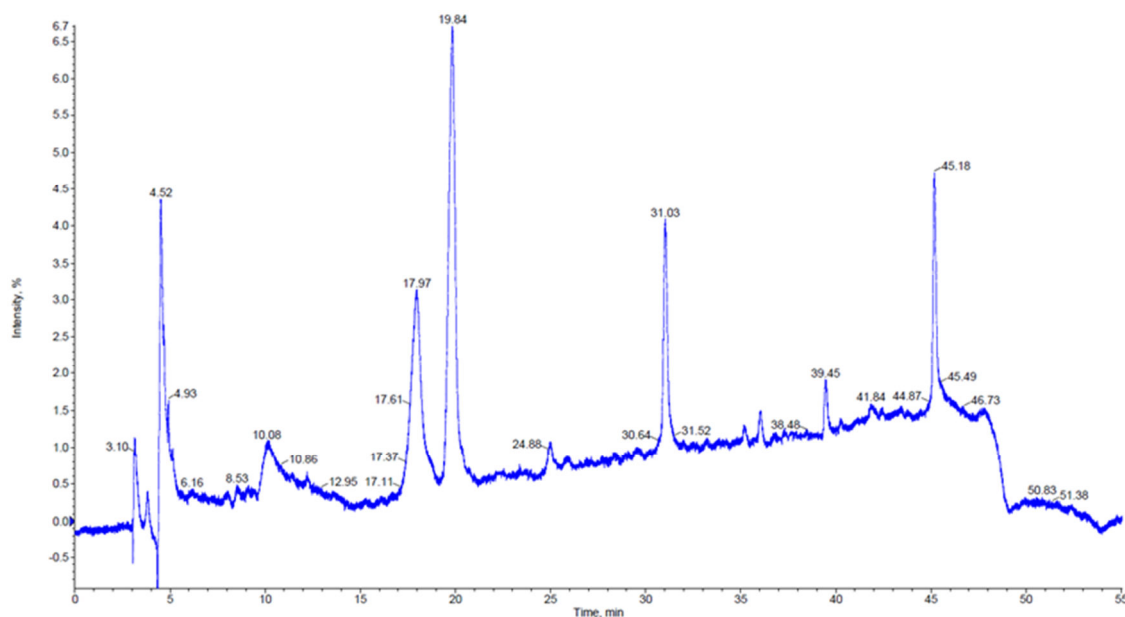


Abbildung 86: HPLC-UV-Chromatogramm einer Vollblutprobe einer AhR-Wildtyp-Kontrolle; Messwellenlänge 260 nm

Zur Prüfung welche Massen in einer Probe vorhanden sind, wurden die HPLC-UV-Chromatogramme und Massenspuren der gemessenen Proben herangezogen. Hierfür wurden die von den einzelnen UV-Peaks erzeugten Haupt-m/z-Verhältnisse herangezogen. Danach wurden diese, von einem bestimmten UV-Signal erzeugten m/z-Verhältnisse, in weiteren Messungen fragmentiert (*product ion scan*-Messung), um die chemischen Strukturen der Verbindungen, welche die beobachteten Massensignale verursachten, weiter zu charakterisieren. Als Beispiel wird im Folgenden die Identifizierung eines Metaboliten anhand des Massensignals von m/z = 177,3 gezeigt. Abbildung 87 zeigt ein HPLC-UV-Chromatogramm, das *extracted ion chromatogram* (XIC) bei einem m/z-Verhältnis von 177,3 sowie den Q1-Scan (Quadrupol 1) der m/z-Verhältnisse eines ausgewählten Peaks in einem Elutionsbereich von 10,4–11,4 min.

Zuerst wurde ein Peak, der von Interesse erschien, im HPLC-UV-Chromatogramm ausgewählt. Im gezeigten Beispiel ist dies der Peak mit der Retentionszeit von 10,87 min (siehe Abbildung 87, obere Darstellung). Als nächstes wurden die Massensignale um den ausgewählten Peak (± 1 min) abgezogen (nicht dargestellt), um m/z-Verhältnisse, die nicht zum ausgewählten Peak gehören, zu eliminieren. Alle nun beobachteten m/z-Verhältnisse mit einer Intensität ≥ 1000 cps wurden einzeln geprüft, ob sie sich vom Hintergrundrauschen signifikant abheben. Von allen geprüften m/z-Verhältnissen in Q1 wurde nun das m/z-Verhältnis von 177,3 ausgewählt (Abbildung 100, untere Darstellung). Dieses m/z-Verhältnis führt im XIC zu einem Doppelpeak mit zwei Intensitätsmaxima bei den Retentionszeiten von 9,24 min und 10,96 min (Abbildung 100, mittlere Darstellung).

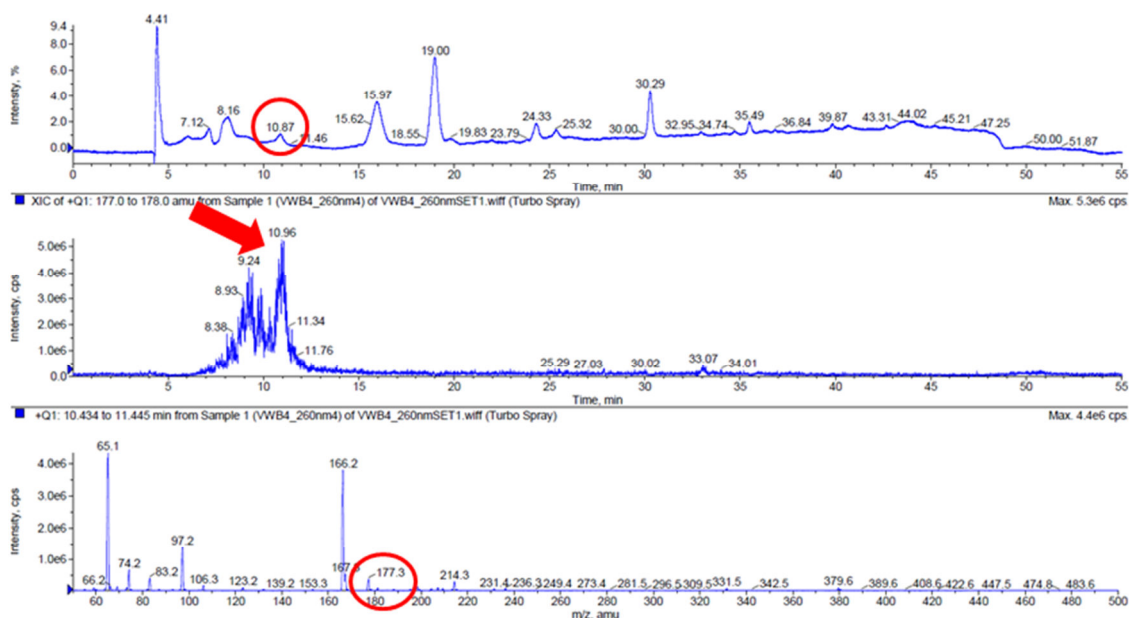


Abbildung 87: Beispiel für die Identifizierung eines Metaboliten im Vollblut; AhR-Knockout TCDD-behandelt; Obere Darstellung: HPLC-UV-Chromatogramm bei einer Messwellenlänge von 260 nm; Interner Standard: Anthranilsäure (125 μ M); Mittlere Darstellung: *extracted ion chromatogram* (XIC) bei einem m/z-Verhältnis von 177,3; Untere Darstellung: Q1-Scan der m/z-Verhältnisse des im UV-Chromatogramm ausgewählten Peaks im Elutionsbereich von 10,4–11,4 min.

Um nun dieses m/z -Verhältnis strukturell weiter zu charakterisieren, wurde ein *product ion scan* durchgeführt. Dabei kann nur ein vorher ausgewähltes m/z -Verhältnis Q1 passieren, welches dann in Q2 fragmentiert wird. Die gebildeten Fragmente (Tochterionen) werden dann in Q3 analysiert. Anhand des erhaltenen Fragmentmusters können anschließend durch Vergleich mit Literatur-Fragmentmustern aus Datenbanken wie z. B. HMDB (*Human Metabolome Database*), MELTIN (*Metabolite and Tandem MS Database*) oder Massbank (*High Quality Mass Spectra Database*), mögliche Verbindungen/Strukturen identifiziert werden, die das beobachtete m/z -Verhältnis verursachen können. In Abbildung 88 ist das erhaltene Fragmentmuster des m/z -Verhältnisses 177,3 aus Abbildung 87 im Retentionsbereich von 10,2–11,3 min gezeigt. Es konnten die Fragmente mit den m/z -Werten 160,0, 142,0, 132,3, 114,8 sowie 104,7 detektiert werden. Ein Vergleich mit den Datenbanken zeigte, dass es sich bei diesem m/z -Verhältnis um den Metaboliten Serotonin handeln könnte. Um dies zu überprüfen, wurde reines Serotonin als Referenzsubstanz ebenfalls zunächst im *full scan* und anschließend im *product ion scan* gemessen.

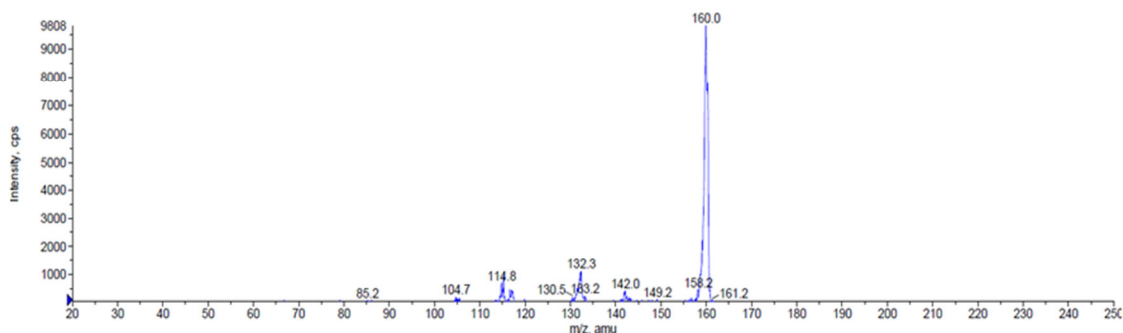


Abbildung 88: Fragmentierungsmuster des Massesignals von 177,3 m/z aus AhR-Knockout TCDD-behandelt; *product ion scan*; Kollisionsenergie (CE) 25 eV; Retentionszeit (t_R): 10,2–11,3 min

In Abbildung 89 ist oben das Fragmentmuster des Serotoninstandards und unten dessen XIC dargestellt.

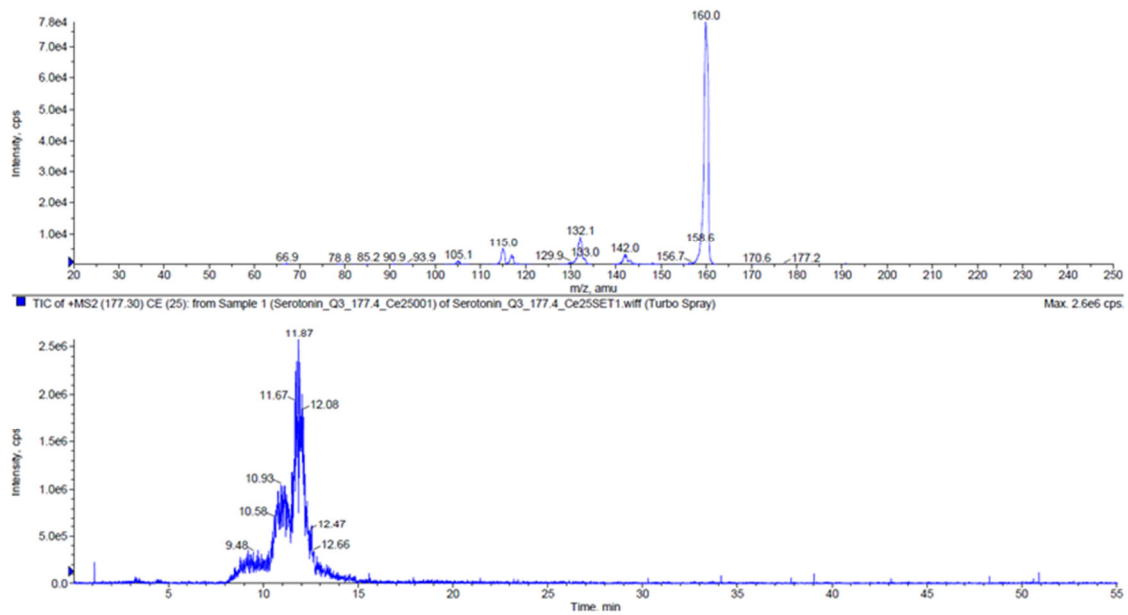


Abbildung 89: Obere Darstellung: Fragmentierungsmuster der Reinsubstanz Serotonin; t_R : 10,9- 11,8 product ion scan; Kollisionsenergie (CE) 25 eV; Untere Darstellung: XIC der Reinsubstanz Serotonin (177,3 m/z)

Im *product ion scan* des Serotonins konnten die Fragmente mit den m/z-Verhältnissen von 160,0, 142,0, 132,1, 115,0, 105,1 detektiert werden. Serotonin ($M = 176,2$ g/mol; $m/z = 177,3$) erzeugt im XIC einen Doppelpeak mit Intensitätsmaxima bei den Retentionszeiten (t_R) von 10,93 min und 11,87 min. Ein Vergleich der von der Referenzsubstanz und der untersuchten Probe verursachten Fragmente von $m/z = 177,3$ sowie der Retentionszeiten zeigt, dass es sich bei dem in der Probe beobachteten m/z-Verhältnis von 177,3 tatsächlich um den Metaboliten Serotonin handelte.

In der folgenden Tabelle sind sämtliche Metaboliten die im Vollblut der Maus identifiziert werden konnten sowie die dazugehörigen Molekülmassen, die Molekülpeaks $[M+H]^+$ und Fragmente aufgeführt.

Tabelle 73: Im Maus-Vollblut identifizierte Metaboliten mit den dazugehörigen Molekülmassen, Massenpeaks $[M + H^+]$ und den erzeugten Fragmenten (CE 10-25 e.V.)

Metaboliten	Molekülmasse [g/mol]	$[M + H^+]$ m/z	Fragmente m/z
Alanin	89,1	90,1	72,1; 44,0
Arginin	174,2	175,1	158,1; 130; 115,7; 69,9
Betain	117,15	118,2	118,1; 58,9
Carnitin	161,2	162,4	103,3
Creatin	131,13	132,2	113,9; 90,0; 86,0
Cytidin-5'-diphosphat (CDP)	403,01	404,2	387,1; 266,7; 146,9; 129,5; 121,1; 105,2
2'-Deoxycytidin- diphosphat (dCDP)	386,1	387,5	120,9; 105,3
Glutamin	146,15	147,1	130; 101,1; 84,1
Glycin	75,1	76,1	48,3; 30,4
Histidin	155,16	156,2	110,2; 95,3; 82,7
Leucin	131,18	132,2	86,09; 69; 43,9; 43,1
Methionin	149,21	150,3	133,1; 103,9; 85,9; 74,4; 60,8; 56,1
Nicotinamid	122,12	123,2	106,2; 95,9; 79,8; 77,7
Phenylalanin	165,19	166,3	148,9; 130,8; 120,0; 106,8; 103,1
Prolin	115,13	116,1	70,1
Serotonin	176,21	177,2	160,0; 142,0; 132,1; 115,0; 105,1
Taurin	125,15	126,1	108,0; 44,1
Tryptophan	204,2	205,2	188,0; 159,1; 146,1
Tyrosin	181,19	182,2	165,1; 147,0; 136,2; 123,0; 119,1
Valin	117,15	118,1	72,0; 55,2

Auffallend ist, dass mit der angewendeten Methode viele hydrophile Substanzen, vornehmlich Aminosäuren, identifiziert werden konnten. Viele der beobachteten Massensignale in den verschiedenen Proben konnten jedoch nicht zugeordnet werden. In weiteren Studien sollten daher weitere Aufarbeitungsmethoden ausprobiert bzw. überprüft werden, um auch lipophilere Substanzen erfassen zu können. Außerdem sollte eine Datenbank mit Fragmentierungsmustern von natürlich im Blut vorkommenden Substanzen angelegt werden, um weitere Metaboliten in den Blutproben von AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäusen identifizieren zu können. Als Ergebnis kann man feststellen, dass diese Aufarbeitungsmethode eine gute Basis für das *metabolic profiling* darstellt.

4.8.2 Metabolic profiling: Vollblut

Nach der Identifizierung einiger Metaboliten im Blut der Maus, wurden nun die *full scan*-Messungen der Blutproben von mit TCDD-behandelten und unbehandelten (Kontrolle)

weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen mit denen der AhR-defizienten-Mäuse verglichen, um mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Genotypen festzustellen. Die Messungen wurden mit Vollblutproben weiblicher Mäuse mit einem Stichprobenumfang von drei durchgeführt.

In Abbildung 90 sind das HPLC-UV-Chromatogramm einer Vollblutprobe einer AhR-Wildtyp-Kontrolle mit der einer AhR-Knockout-Kontrolle überlagert dargestellt.

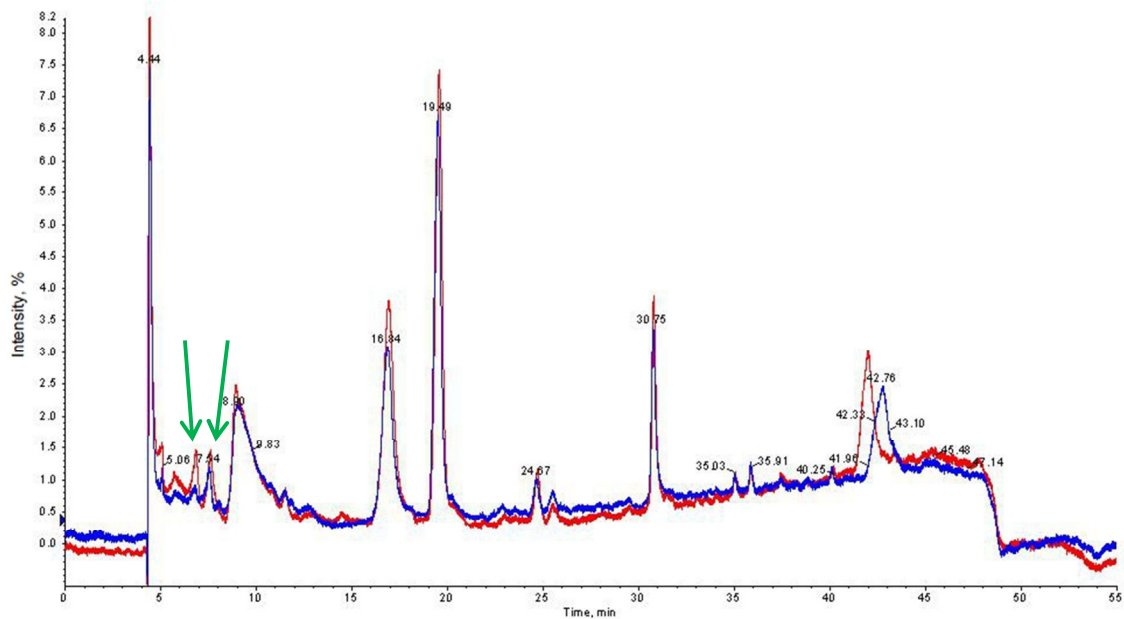


Abbildung 90: HPLC-UV-Chromatogramme; Vergleich von Vollblutproben der unbehandelten, weiblichen Kontrollmäuse; Messwellenlänge 260 nm; Rot= Wildtyp; Blau= AhR-Knockout; Interner Standard: Anthranilsäure (125 μ M)

Ein Vergleich beider HPLC-UV-Chromatogramme zeigte, dass zwei Peaks im vorderen Bereich des Chromatogramms bei den Retentionszeiten 6,8 min und 7,5 min (in Abbildung 90 mit Pfeilen markiert), in Wildtyp-Mäusen ausgeprägter waren als in Knock Out-Tieren. Nach Auswertung der Massenspektren beider Peaks, zeigte sich, dass sich die höhere Ausprägung der Peaks nur auf die Intensität einiger m/z-Verhältnisse bezog und nicht auf die Präsenz unterschiedlicher m/z-Verhältnisse. Der weitere Vergleich beider HPLC-UV-Chromatogramme zeigte, dass die bei der Messwellenlänge von 260 nm vorhandenen Peaks in beiden Genotypen ebenfalls vorhanden waren. Allerdings wiesen die meisten Peaks in AhR-Wildtyp-Kontrollmäusen eine leicht höhere Intensität auf als in AhR-defizienten-Kontrollmäusen.

Um weitere Veränderungen bzw. Unterschiede im Metabolom von AhR-Wildtyp-Mäusen und AhR-Knockout-Mäusen zu identifizieren, wurden weibliche Mäuse beider Genotype einmalig

mit TCDD (25 µg/kg KG) behandelt. Nach fünf Tagen wurde die Behandlung beendet, nach dem Exitus der Tiere das Blut entnommen und für die HPLC-MS/MS Messungen aufgearbeitet (siehe Kapitel 3.4.7).

Abbildung 91 zeigt die überlagerten HPLC-UV-Chromatogramme vom unbehandelten AhR-Wildtyp und vom TCDD-behandelten AhR-Wildtyp.

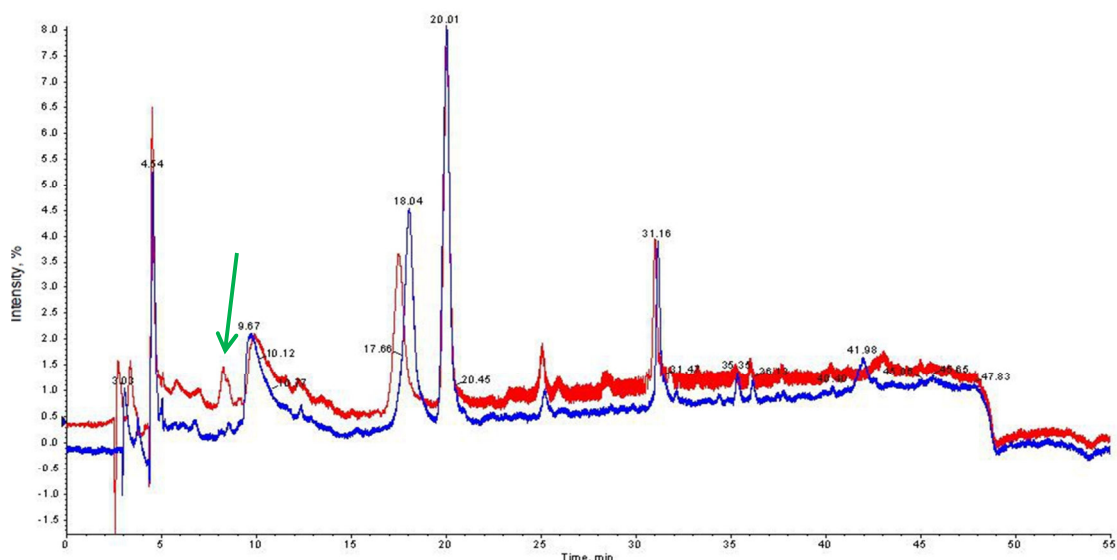


Abbildung 91: HPLC-UV-Chromatogramme (Vollblut); Vergleich Wildtyp-Kontrolle (blau) mit TCDD-behandeltem Wildtyp (rot); Messwellenlänge 260 nm; Interner Standard: Anthranilsäure (125 µM)

Ein Vergleich der beiden HPLC-UV-Chromatogramme zeigte, dass einige Peaks im frühen Elutionsbereich (Retentionszeit zwischen 8–9 min), in der Vollblutprobe des TCDD-behandelten AhR-Wildtyps ausgeprägter waren als in der untersuchten AhR-Wildtyp-Kontrollmaus. Die Auswertung der dazugehörigen Massenspuren zeigte, dass in der AhR-Wildtyp-Kontrollmaus das m/z-Verhältnis von 182,2 bei einer Retentionszeit von 8,9 min eine höhere Intensität aufwies als in der TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Maus. Dabei handelte es sich um den Metaboliten Tyrosin.

Ein Vergleich der HPLC-UV-Chromatogramme einer AhR-Knockout-Kontrollmaus mit einer TCDD-behandelten AhR-Knockout-Maus (Abbildung 92) lässt erkennen, dass die meisten der bei einer Wellenlänge von 260 nm vorhandenen Peaks sowohl in der Kontrolle wie auch im behandelten Tier aufzufinden waren. Auffallend waren die beiden Peaks in einem Retentionsbereich von 24–26 min, die nur im der TCDD-behandelten Tier vorhanden waren. Nach Auswertung der dazugehörigen Massenspur des Peaks mit der Retentionszeit von 25,1 min, zeigte sich, dass das m/z-Verhältnisse von 206,3 für diesen Peak im HPLC-UV-Chromatogramm der TCDD-behandelten AhR-Knockout-Maus verantwortlich war. Das m/z-Verhältnisse konnte jedoch keinem Metaboliten zugeordnet werden

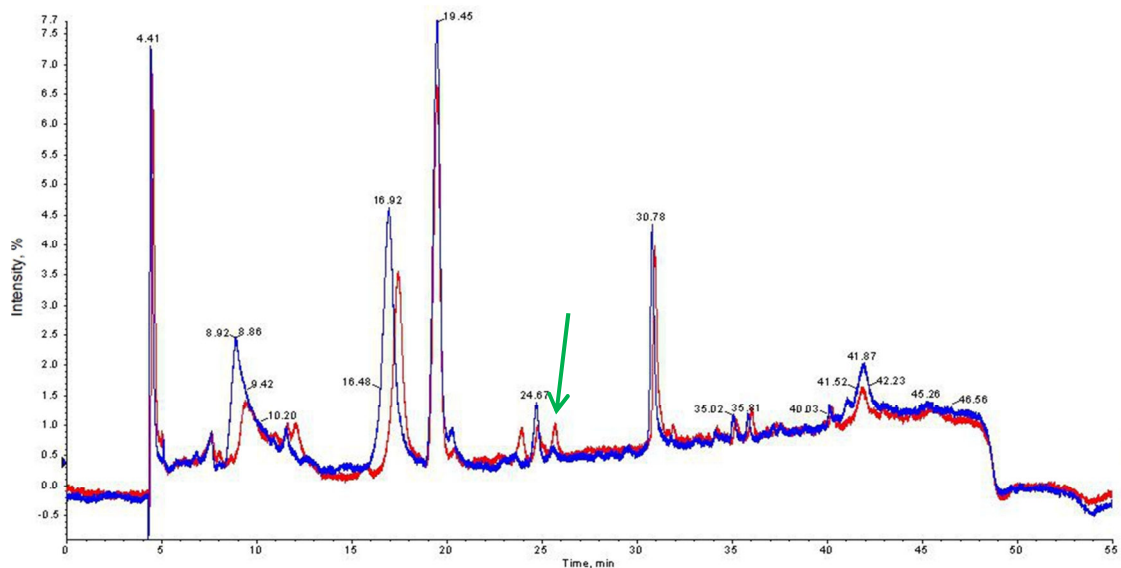


Abbildung 92: HPLC-UV-Chromatogramme (Vollblut); Vergleich AhR-Knockout-Kontrolle (blau) mit TCDD-behandelter AhR-Knockout-Maus (rot); Messwellenlänge 260 nm, Interner Standard: Anthranilsäure (125 μ M)

In Abbildung 93 sind die HPLC-UV-Chromatogramme einer TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Maus mit einer TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Maus überlagert dargestellt. Der Vergleich beider Chromatogramme zeigte wenige Unterschiede zwischen den behandelten Genotypen. Die meisten Peaks waren in beiden HPLC-UV-Chromatogrammen zu beobachten. Allerdings waren im vorderen Bereich des Chromatogramms der AhR-Knockout-Maus einige Peaks in einem Retentionsbereich von 5 bis 10 min ausgeprägter als in der AhR-Wildtyp-Maus. Nach Auswertung der dazugehörigen Massenspektren, war zu erkennen, dass die Intensitäten der m/z -Verhältnisse in der AhR-Knockout-Maus etwas höher war als in der AhR-Wildtyp-Maus. Jedoch war der UV-Peak bei 9,30 min in der Wildtyp-Maus höher als in der Knockout-Maus. Die dazugehörige Massenspur zeigte, dass die Intensität des m/z -Verhältnisses von 132,2 in der behandelten AhR-Wildtyp-Maus größer ist als in der behandelten AhR-Knockout-Maus. Das Massensignal von 132,2 m/z bei einer Retentionszeit von 9,30 min konnte der Aminosäure Leucin zugeordnet werden. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete UV-Peak bei einer Retentionszeit von 9,30 min im Chromatogramm durch Leucin verursacht wurde, da Leucin bei einer Wellenlänge von 260 nm praktisch nicht absorbiert. Der UV-Peak wurde daher höchstwahrscheinlich durch eine andere Verbindung verursacht, möglicherweise durch eine Verbindung mit einem anderen m/z -Verhältnis.

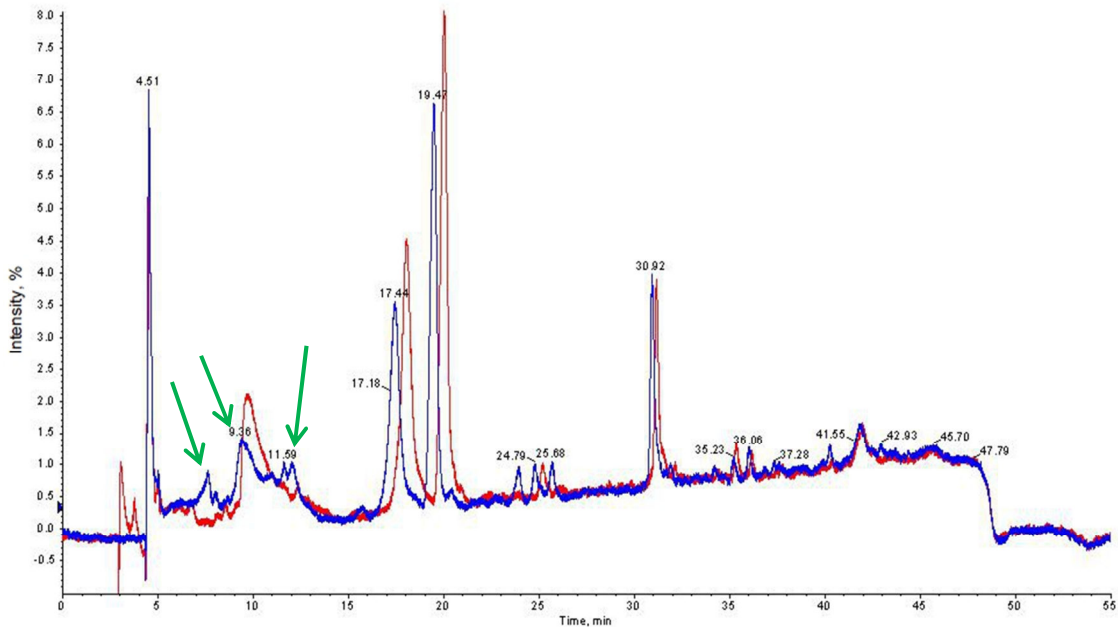


Abbildung 93: HPLC-UV-Chromatogramme (Vollblut); Vergleich TCDD-behandelter Wildtyp (rot) mit TCDD-behandeltem AhR-Knockout (blau); Messwellenlänge 260 nm; Interner Standard: Anthranilsäure (125 μM)

Zusammenfassend ist zu sagen, dass anhand der HPLC-UV-Chromatogramme bei einer Messwellenlänge von 260 nm einige Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten. Für einen genaueren Vergleich der beiden Genotypen wurden die *full-scan*-Messungen weiter ausgewertet und die beobachteten Massenpeaks zur besseren Vergleichbarkeit integriert. Die ermittelten Integrale sind in Tabelle 74 zusammengefasst. Die Integration der Massenpeaks in den *full scan*-Messungen wurde von Herrn Dr. Werner Römisch-Margl (HelmholtzZentrum München) durchgeführt. Die ermittelten Integrale wurden zur Sicherstellung der unmittelbaren Vergleichbarkeit weiterhin einer Volumenkorrektur unterzogen (siehe Kapitel 3.4.7). Aufgrund des hohen Signalrauschens an der HPLC-MS/MS konnten nicht alle Peaks bereits identifizierter Metaboliten integriert werden. Eine vollständige Liste aller detektierten m/z -Verhältnisse mit den Integralen (plus Standardabweichung) ist im Anhang (Tabelle 82) zu finden.

Tabelle 74: Vergleich der Integrale identifizierter Metaboliten und unbekannter Massensignale in den LC-MS-Messungen; gemittelte Integrale; n = 3; One-tailed unpaired Student's t-test; * = p < 0,05, ** = p < 0,01 (Kontrolltier vs. TCDD-behandeltes Tier); # = p ≤ 0,05, ## = p ≤ 0,01, ### = p ≤ 0,001 (AhR-Wildtyp TCDD behandelt vs. AhR-Knockout TCDD-behandelt); + = p ≤ 0,05 (AhR-Wildtyp-Kontrolltier vs. AhR-Knockout-Kontrolltier)

Metabolit bzw. m/z-Verhältnis und Retentionszeit (t _R) in min	Integral cps*t			
	AhR ^{+/+}		AhR ^{-/-}	
	Kontrolle	TCDD-behandelt	Kontrolle	TCDD-behandelt
Arginin; t _R = 4,5	1.88E+06	1.99E+06	2.16E+06	2.06E+06
Betain; t _R = 4,8	2.33E+06	1.48E+06	3.25E+06	2.11E+06
Cytidin-5'-diphosphat; t _R = 36	5.91E+06	8.57E+06	5.85E+06	5.63E+06
Deoxycytidin 5'-diphosphat; t _R = 36,1	3.48E+07	4.13E+07	3.74E+07	3.39E+07
Leucin; t _R = 8,8	1.76E+07*	2.17E+07*	2.15E+07	1.80E+07
Phenylalanin; t _R = 12,3	4.27E+07	3.55E+07#	4.69E+07	4.72E+07#
Serotonin; t _R = 12	2.05E+06	1.72E+06	1.67E+06	3.87E+06
Tryptophan; t _R = 17,5	4.02E+07	3.43E+07	4.72E+07	4.33E+07
Tyrosin; t _R = 9,3	2.66E+06	1.91E+06#	1.78E+06	3.57E+06#
87.1 m/z; t _R = 50	3,09E+07	2,70E+07	3,45E+07*	1,79E+07*
191.2 m/z; t _R = 33,2	1,79E+06*	2,19E+07**#	4,14E+06	3,05E+06#
203.2 m/z; t _R = 4,2	1,83E+06	1,92E+06	2,99E+06*	1,21E+06*
208.3 m/z; t _R = 33,2	4,92E+05**	4,40E+06***##	9,94E+05	6,51E+05###
213.3 m/z; t _R = 33,2	2.01E+06*	1.41E+07**#	3.73E+06	2.67E+06#
213.2 m/z; t _R = 50,1	7,35E+06	4,86E+06	7,80E+06**	2,59E+06**
227.3 m/z; t _R = 31	7,33E+06+	5,96E+06	5,72E+06+	6,39E+06
243.3 m/z; t _R = 18,6	4.93E+06*	6.23E+06*###	3.98E+06	1.42E+06####
243.4 m/z; t _R = 20,1	9,96E+06	1,32E+07###	9,86E+06*	4,35E+06*##
347.5 m/z; t _R = 35,2	2,26E+06	2,84E+06	2,58E+06**	1,78E+06**
355.5 m/z; t _R = 48,5	6,87E+06	9,21E+06	6,94E+06*	9,98E+06*
380.4 m/z; t _R = 20,1	3,24E+06	2,33E+06#	3,36E+06*	7,62E+05*#
385.3 m/z; t _R = 31	2,93E+06	3,17E+06#	3,04E+06*	4,74E+06*#
403.6 m/z; t _R = 33,3	1.02E+06*	3.89E+06*#	1.27E+06*	7.99E+05*#
431.4 m/z; t _R = 42,7	2,35E+06	3,74E+06#	3,59E+06*	6,51E+06*#
485.6 m/z; t _R = 20,3	1,64E+06+**	2,67E+06***###	5,85E+05+	2,82E+05####

Ein Vergleich der Integrale der einzelnen Substanzen bzw. m/z-Verhältnisse zeigt, dass Unterschiede zwischen Wildtyp und AhR-Knockout vorhanden waren, die entweder schon in Kontrollmäusen auftraten oder aus der Behandlung der Mäuse mit TCDD resultierten.

Betrachtet man die Aminosäuren Arginin, Leucin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin so ist festzustellen, dass in behandelten AhR-Knockout-Mäusen z. B. eine signifikant höhere Phenylalanin-Konzentration im Plasma zu finden war als in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen. Signifikant mehr Leucin konnte in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Ein Vergleich der Genotypen zeigte, dass in AhR-Knockout-Kontrollmäusen eine höhere Plasmakonzentration von Arginin und Leucin gefunden wurde als in AhR-Wildtyp-Kontrollmäusen. Nach der Behandlung mit TCDD findet man mehr Leucin im AhR-Wildtyp als im AhR-Knockout, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Da nur in behandelten Wildtyp-Mäusen und nicht in behandelten AhR-Knockout-Mäusen mehr Leucin zu finden war als in den entsprechenden Kontrollen, könnte dies auf eine AhR-abhängige Regulierung des Leucin Metabolismus durch TCDD hinweisen. In einer Studie von O’Kane *et al.* (2013) konnte ähnliches in Sprague-Dawley-Ratten beobachtet werden. Nach TCDD-Behandlung (0,1 µg TEQ/kg) wurden dort erhöhte Konzentrationen von Leucin und Tyrosin im Plasma detektiert (O’Kane *et al.*, 2013). Die Tyrosin-Konzentration in den eigenen Untersuchungen nahm im Plasma von AhR-Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit TCDD hingegen ab, während in AhR-Knockout-Tieren höhere Tyrosin-Konzentrationen als in den Kontrolltieren detektiert werden konnte. Es ist daher nicht möglich eindeutig festzustellen, ob der Tyrosin-Metabolismus AhR-abhängig oder -unabhängig durch TCDD beeinflusst wird.

Die Phenylalanin-Konzentration war im Plasma unbehandelter AhR-Wildtyp-Mäuse auf dem gleichen Level wie im Plasma unbehandelter AhR-Knockout-Tiere. Im Plasma von AhR-Knockout-Mäusen war durch Behandlung mit TCDD signifikant mehr Phenylalanin vorhanden als in behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen. Die Konzentration von Phenylalanin nahm durch TCDD-Behandlung im Wildtyp ab, während sie im Knockout etwa auf dem gleichen Level wie in der Kontrolle war. Viluksela *et al.* (1999) konnten jedoch an weiblichen Long-Evans-Ratten nachweisen, dass die Konzentration von Phenylalanin im Plasma durch TCDD-Behandlung (50µg/kg KG) erhöht wurde. Inwieweit die Regulierung des Phenylalanin-Metabolismus durch TCDD AhR-abhängig oder -unabhängig abläuft, kann anhand dieser Ergebnisse nicht geklärt werden.

Die Konzentration von Tryptophan in den Vollblutproben war in AhR-Knockout-Kontrollmäusen und TCDD-behandelten AhR-Knockout-Mäusen im Vergleich zu AhR-Wildtyp-Kontrollmäusen und TCDD-behandelten AhR-Wildtyp-Mäusen erhöht. Durch die TCDD-Behandlung nahm die Konzentration von Tryptophan sowohl im Wildtyp wie auch im Knockout leicht ab. Dies deutet auf eine AhR-unabhängige Regulierung des Tryptophan-Metabolismus durch TCDD hin. Im Gegensatz dazu berichteten O’Kane *et al.* (2013), dass im Plasma von TCDD-behandelten (0,1 µg TEQ/kg) Sprague-Dawley-Ratten eine erhöhte

Tryptophan-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte (O’Kane et al., 2013).

Die gezeigten Unterschiede im Aminosäure-Stoffwechsel zwischen TCDD-behandelten Wildtyp- und AhR-defizienten Mäusen deuten auf eine mögliche Funktion des AhR im Aminosäure-Stoffwechsel hin.

Die nicht-proteinogene-Aminosäure Betain ist eine quartäre Ammoniumverbindung, die ein wichtiger Methylgruppdonor im Organismus ist (Ruttloff, 1979). Die Betain-Plasmakonzentration war in AhR-Knockout-Kontrollmäusen höher als in Wildtyp-Kontrollmäusen. Nach Behandlung der Mäuse mit TCDD war die Betain-Plasmakonzentration sowohl in Knockout-Tieren wie auch in Wildtyp-Tieren geringer als in den jeweiligen Kontrollen. Im Plasma behandelter Knockout-Mäuse war jedoch eine höhere Betain-Konzentration vorhanden als im Plasma behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse. Die beobachteten Unterschiede waren aber nicht signifikant.

Durch Behandlung der Mäuse mit TCDD war im Plasma von Knockout-Mäusen eine etwas höhere Serotonin-Konzentration zu verzeichnen als in Wildtyp Mäusen. Ein Vergleich der beiden Kontrollen zeigt, dass etwas mehr Serotonin in Wildtyp-Tieren zu vorhanden war. Auch hier war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Im Plasma behandelter Wildtyp-Mäuse war eine höhere Konzentration von Cytidin-5'-diphosphat zu beobachten als in behandelten Knockout-Tieren, die Konzentration nahm durch Behandlung mit TCDD in Wildtyp Tieren zu, in Knock Out-Tieren blieb sie etwa auf dem gleichen Level. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es zwischen Wildtyp und AhR-Knockout leichte Unterschiede im Aminosäure-Haushalt vorhanden waren, die sich durch Behandlung mit TCDD veränderten. Die Konzentration von Tyrosin im Plasma z. B. war nach der Behandlung mit TCDD in AhR-Knockout-Mäusen signifikant höher als in AhR-Wildtyp-Mäusen. Dagegen war die Tyrosin-Konzentration in den Kontrolltieren höher in Wildtyp-Mäusen als in Knockout-Mäusen, jedoch nicht signifikant. Für die beiden Aminosäuren Phenylalanin und Leucin waren ebenfalls signifikante Unterschiede zu beobachten. In Wildtyp-Mäusen war durch die Behandlung mit TCDD eine signifikant höhere Leucin-Plasmakonzentration im Vergleich zur Kontrolle vorhanden. In behandelten Knockout-Mäusen war eine signifikant höhere Konzentration von Phenylalanin im Plasma zu verzeichnen im Vergleich zu behandelten Wildtyp-Mäusen. Im Tryptophan-Metabolismus waren ebenfalls leichte Unterschiede vorhanden, z. B. war durch Behandlung mit TCDD in AhR-Knockout-Mäusen die Plasmakonzentration von Tryptophan und Serotonin höher als in behandelten Wildtyp-Mäusen. In den Wildtyp-Kontrollmäusen war hingegen die Konzentration von Tryptophan und Serotonin im Vergleich zu den Knockout-Kontrollmäusen erhöht. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

Bei den nicht zugeordneten m/z-Verhältnissen konnten, wie in Tabelle 74 zu sehen ist, einige signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen beobachtet werden, die entweder schon in Kontrollmäusen vorhanden waren oder durch Applikation von TCDD verstärkt bzw. zum Gegenteil verändert wurden.

4.9 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Dioxine umfassen polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und polychlorierte Dibenzofurane. Diese entstehen als unbeabsichtigte Nebenprodukte zahlreicher Industrie- und Verbrennungsprozesse in Anwesenheit von Chlor und sind als Folge davon ubiquitär in der Umwelt vorhanden. Aufgrund ihrer Persistenz und sehr hohen Lipophilie reichern sie sich in der Nahrungskette, vor allem im tierischen Fettgewebe an. So ist der Mensch täglich einer gewissen Dioxinbelastung ausgesetzt, die im Durchschnitt etwa 0,7 pg TEQ/kg KG (TEQ = *toxic equivalents*) beträgt (EFSA, 2010; Poland und Knutson, 1982). Die Umweltkontaminante 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), die zu den Dioxinen zählt und deren Leitverbindung darstellt, verursachte im Tierversuch eine Vielzahl toxischer Effekte und wirkte unter anderem immunotoxisch, teratogen und hepatotoxisch (IARC, 1997). Im Tierversuch an Ratten zeigte TCDD ein erhöhtes hepatokarzinogenes Potential (Kociba *et al.*, 1978). Im Jahre 1997 wurde TCDD von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als krebserregend für den Menschen eingestuft (Gruppe 1). Die molekularen Mechanismen der kanzerogenen Wirkung konnten aber bisher nicht vollständig aufgeklärt werden (IARC, 1997; Knerr und Schrenk, 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass TCDD im Tierversuch an Mäusen Arylhydrocarbon-Rezeptor-(AhR)-vermittelt durch direkte Regulierung pro-fibrotischer Signalwege zur Leberfibrose führte (Pierre *et al.*, 2014). Die Entdeckung des AhR (Poland *et al.*, 1976), der TCDD mit hoher Affinität bindet, sowie gezielte Untersuchungen an AhR-defizienten Tieren, führten zur wissenschaftlichen Auffassung, dass die meisten, wenn nicht sogar alle toxischen Effekte von TCDD durch Bindung an den AhR vermittelt werden (Birnbaum, 1994; Holsapple *et al.*, 1991; IARC, 1997).

Der AhR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung durch Fremdstoffe wie z. B. TCDD zu einer Induktion einiger Gene der „klassischen“ murinen AhR-Genbatterie wie z. B. *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* und *Aldh3a1* führt. Der AhR besitzt diverse endogene Funktionen und ist in vielfältigen Systemen wie dem Immun-, Herz-Kreislauf- und Nervensystem sowie die Entwicklung des Fortpflanzungsapparat involviert (Nebert *et al.*, 2004, 2000). In einigen neueren Studien wurden jedoch auch AhR-unabhängige TCDD-Wirkungen beschrieben (Boutros *et al.*, 2009; Tijet *et al.*, 2006)

Die Tierstudie für die vorliegende Arbeit wurde aus zwei Gründen durchgeführt. Zum einen sollten die Genexpressionsmuster in Leber und Niere Ahr-defizienter-Mäuse mit denen von

AhR-Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit TCDD untersucht werden, zum anderen sollte eine Metabolomics-Studie durchgeführt werden, um eine AhR-Metabolomics-Plattform zu etablieren. Damit sollte die Grundlage geschaffen werden, um die Gesamtheit der messbaren Veränderungen des endogenen Metabolitenspektrums in AhR-defizienten- und Wildtyp-Mäusen, nach TCDD-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, aufzuklären. Beide Vorhaben sollten dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Toxizität von TCDD sowie über den Einfluss des AhR auf die TCDD-Toxizität und über die physiologischen Rolle des AhR zu gewinnen.

Zunächst wurden weibliche und männliche AhR-defiziente- und Wildtyp-Mäuse im Alter von fünf bis acht Monaten per Schlundsonde einmalig mit einer Dosis von 25 µg/kg KG TCDD oder mit Maiskeimöl als Vehikelkontrolle behandelt. Nach fünf Tagen wurden die Tiere getötet, das Blut entnommen und die Organe (Leber, Niere, Lunge und Milz) isoliert. Die Organe wurden sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C im Biofreezer bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Das Blut wurde mittels *solid phase extraction* (SPE)-Kartuschen aufgearbeitet und bis zur Trockene eingeengt und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Das relative Lebergewicht männlicher und weiblicher AhR-defizienter-Mäuse war geringer als das relative Lebergewicht männlicher und weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse. In den Weibchen war es extrem signifikant reduziert. Dies ist auf die verminderte Größe der Hepatozyten zurückzuführen, was ein Resultat des portosystemischen Shunts der AhR-defizienter-Mäuse ist (Lahvis *et al.*, 2000). Die mamorierte und schwammartige Oberflächenstruktur der Leber AhR-defizienter-Mäuse könnte auf die ausgeprägte Fibrose im Portaltrakt sowie auf eine ausgedehnte extramedulläre Hämatopoese in den Lebern zurückzuführen sein (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996). Das relative Nierengewicht war dagegen in AhR-defizienten-Mäusen größer als in AhR-Wildtyp-Mäusen. In Weibchen war dieser Unterschied statistisch signifikant. Das höhere Nierengewicht von AhR-Knockout-Mäusen ist möglicherweise auf eine veränderte Gefäßarchitektur der Nieren zurückzuführen (Lahvis *et al.*, 2000). Die Behandlung der Mäuse mit TCDD führte zu einer Zunahme des Leber- und Nierengewichtes, wobei das Lebergewicht stärker zunahm als das Nierengewicht. In Wildtyp-Mäusen war die Zunahme des Lebergewichtes stärker als bei Knockout-Mäusen. Das Nierengewicht beider weiblichen Genotypen nahm gleich stark zu, jedoch nahm bei männlichen Knockout-Mäusen das Nierengewicht nach der TCDD-Behandlung leicht ab. Die TCDD-vermittelte Zunahme des relativen Lebergewichtes in AhR-Wildtyp-Mäusen ist auf eine Verfettung der Leber durch die Einlagerung von Triglyceriden zurückzuführen (Lee *et al.*, 2010). Die Zunahme des relativen Nierengewichtes durch TCDD könnte ebenfalls auf eine Verfettung der Niere zurückzuführen sein, da in den Nieren von Wildtyp-Mäusen durch TCDD der Lipidmetabolismus (siehe Microarray-Ergebnisse, Kapitel 4.6.3) induziert wurde. Allerdings spricht die Zunahme des Nierengewichtes TCDD-behandelter Knockout-Mäuse gegen diese Hypothese, da in diesen Tieren der Lipidmetabolismus herunterreguliert war (siehe Microarray-Ergebnisse, Kapitel 4.6.2).

Weitere Gründe für die Gewichtszunahme der Nieren nach Behandlung mit TCDD könnten aber auch die Bildung vakuolärer Zellen in den Nieren sowie Nekrose im renalen Tubulus der Nieren sein (Lin *et al.*, 2011).

In zukünftigen Studien könnten die Nieren AhR-defizienter-Mäuse weitergehend histologisch untersucht werden, um die Gründe der Zunahme der Nierengewichte nach TCDD-Behandlung zu klären.

4.9.1 EROD-Assay

Der Ethoxyresorufin-*O*-deethylase-Assay (EROD) wurde durchgeführt, um die Enzym-Aktivität der Cytochrom-P-450 Enzyme 1a1 und 1a2 in Leber, Niere, Lunge und Milz beider Genotypen mit und ohne TCDD-Behandlung zu vergleichen. Für den EROD wurden zunächst Mikrosomen aus den Geweben der Organe (Leber, Niere, Lunge, Milz) isoliert. Durch Zugabe von NADPH in die Mikrosomensuspension wurde dann die Umsetzung von Ethoxyresorufin zu Resorufin fluorometrisch gemessen. In allen Organen weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse kam es, durch Behandlung mit TCDD, zu einer signifikanten Zunahme der EROD-Aktivität. In den Lebern waren die stärksten Effekte zu beobachten gefolgt von Niere und Lunge. Die schwächsten Effekte waren in den Milzen zu beobachten. Dies war in männlichen Mäusen ähnlich. Die Reihenfolge der EROD-Aktivität war hier Leber >> Lunge > Niere > Milz. In verschiedenen Studien wurde ebenfalls eine TCDD-vermittelte Induktion der EROD-Aktivität in den entsprechenden Organen von Wildtyp-Mäusen beobachtet (Amara *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 1996).

In AhR-defizienten-Mäusen wurde in allen Organen sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Tieren durch TCDD keine erhöhte EROD-Aktivität beobachtet. In den Lebern behandelter Knock Out-Mäuse kam es zu einer hochsignifikanten Abnahme der EROD-Aktivität. Schmidt *et al.* konnten in einer Studie ebenfalls nachweisen, dass TCDD in den Lebern von AhR-defizienten-Mäusen keine Zunahme der EROD-Aktivität bewirkte. Beim Vergleich zwischen AhR-defizienten-Mäusen und AhR-Wildtyp-Mäusen wurde eine verminderte basale EROD-Aktivität in AhR-Knockout-Mäusen festgestellt (Schmidt *et al.*, 1996).

Die Ergebnisse des EROD-Assay zeigen, die Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2 in allen untersuchten Organen in weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäusen AhR-vermittelt durch TCDD induziert wurde. Außerdem wurde festgestellt, dass die EROD-Aktivität in allen Organen mit Ausnahme den Nieren in weiblichen Wildtyp-Mäusen höher war als in männlichen Wildtyp-Mäusen. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität weiblicher Mäuse auf TCDD hin. In einer Studie von Pohjanvirta *et al.* (2012) wurde hingegen gezeigt, dass weibliche Mäuse resistenter gegen eine TCDD-vermittelte Letalität sind.

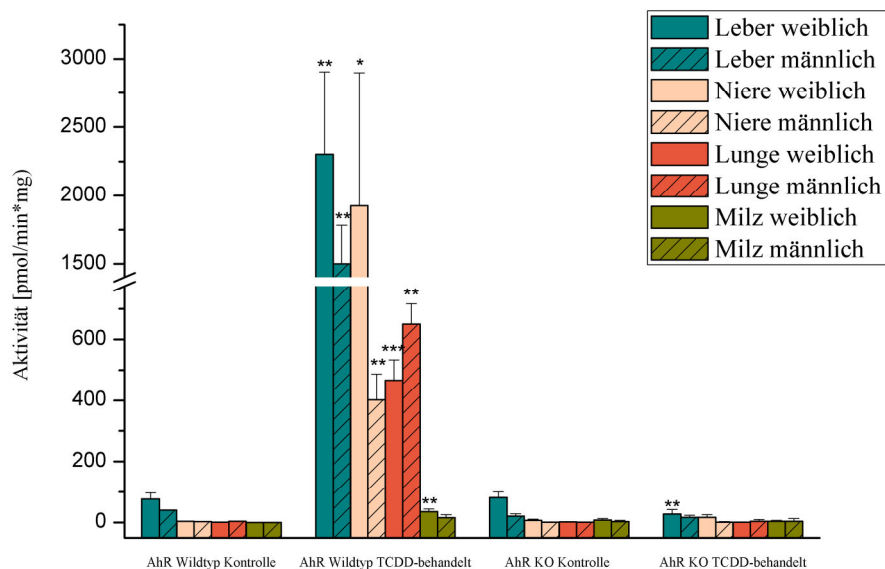


Abbildung 94: Vergleich der EROD-Aktivitäten weiblicher und männlicher Tiere und verschiedener Organe; $2 \leq n \leq 4$; Mittelwerte + Standardabweichungen für weibliche und männliche AhR-Wildtyp-Kontrolle und TCDD-behandelt; Mittelwerte + Spannweiten für männliche AhR-Knockout-Kontrolle und TCDD-behandelt; One-tailed unpaired Student's t-test mit Welch Correction; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$ (Kontrolle vs. TCDD-behandelt)

4.9.2 Western-Blot

Als nächsten Versuch wurden Western Blots durchgeführt, um die im EROD-Assay beobachteten Enzym-Aktivitäten auf Proteinebene zu untersuchen. Dazu sollte ein möglicher Anstieg der Proteinkonzentration der Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 sowie das Vorhandensein des AhR in beiden Genotypen überprüft werden. Der Western Blot des AhR in den Lebern zeigte in Wildtyp-Mäusen und in AhR-defizienten-Mäusen eine Bande des AhR, sowohl in Kontroll-Tieren als auch in TCDD-behandelten Tieren. Aus den Ergebnissen des Western Blots lässt sich schließen, dass in den Lebern von AhR-Knockout-Mäusen ebenfalls ein AhR-Protein gebildet wird. Dies deutet auf einen funktionellen Knock Out des AhR hin. Schmidt *et al.* haben dagegen in einer Studie die Auffassung vertreten, dass in den Lebern AhR-defizienter-Mäuse des gleichen Konstrukts (Austausch von Exons 2) kein AhR-Protein gebildet wird (Schmidt *et al.*, 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western Blots der Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 in den untersuchten Organen der Mäuse bestätigen, dass es sich um einen funktionellen Knock Out handelte, da nur in TCDD-behandelten Wildtyp Mäusen eine Induktion der Enzyme Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1 zu beobachten war. TCDD bewirkte in allen untersuchten Organen weiblicher AhR-Wildtyp-Mäuse eine Induktion der Enzyme Cyp1a1 und Cyp1a2. In männlichen Mäusen induzierte TCDD Cyp1a2 in allen untersuchten Organen, Cyp1a1 war jedoch nur in Leber, Niere und Lunge nachweisbar. Das Enzym Cyp1b1 wurde durch TCDD in Leber, Niere und Lunge

weiblicher Wildtyp Mäuse induziert. In den getesteten Organen weiblicher und männlicher TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse wurde keines der drei untersuchten Enzyme induziert.

4.9.3 Genexpressionsanalysen (Microarray und RT-PCR)

Fünf Tage nach der Behandlung mit TCDD wurden mit Hilfe einer Microarray-Analyse AhR-abhängige und -unabhängige Effekte in den Nieren weiblicher AhR-Wildtyp und AhR-defizienter-Mäuse auf mRNA-Ebene untersucht.

Durch Behandlung weiblicher AhR-Wildtyp und AhR-defizienter Mäuse mit TCDD kam es zur Regulierung einer Vielzahl von Genen. In AhR-Wildtyp-Mäusen wurden durch TCDD 152 Gene hoch- und 20 Gene herunterreguliert. In AhR-defizienten-Mäusen 90 Gene wurden hoch- und 235 Gene herunterreguliert. Auffallend ist, dass in AhR-defizienten-Mäusen mit 325 Genen mehr Gene durch TCDD reguliert wurden als in AhR-Wildtyp-Mäusen (172 Gene). Aufgrund des hohen Datenaufkommens in der Microarray-Analyse wurde eine *gene set enrichment*-Analyse durchgeführt, um die Prozesse herauszufiltern, die in TCDD-behandelten Mäusen am meisten beeinflusst wurden. In Kapitel 4.7.3 ist die Liste mit den 20 am häufigsten beeinflussten *GO terms* der *GO*-Analyse für die beiden Genotypen aufgeführt.

In weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen zeigte die *gene set enrichment*-Analyse, dass einige Gene, die in Prozesse des Fremdstoffmetabolismus, des Lipidmetabolismus sowie des Metabolismus organischer Säuren involviert sind, durch TCDD induziert wurden. Auffallend sind z.B. die Gene *Cyp1a1* und *Cyp1a2*, die in fast allen *GO*-Kategorien der 20 am häufigsten beeinflussten *GO terms* vorkommen. *Cyp1a1* und *Cyp1a2* sind Enzyme des Fremdstoffmetabolismus und zählen zur „klassischen“ AhR-Genbatterie. *Cyp1a1* ist einer der prominentesten Marker für die Aktivierung des AhR durch TCDD (Poland und Knutson 1982, Whitlock *et al.* 1996) und war in den in dieser Arbeit durchgeführten Microarrays der Nieren weiblicher TCDD-behandelter Wildtyp-Mäuse das am stärksten hochregulierte Gen. Weitere Gene des Fremdstoffmetabolismus wie *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10*, *Aldh3a1* sowie *Fmo3* und *Nqo1* wiesen im Microarray und zum Teil in der RT-PCR (Real-Time Polymerase-Kettenreaktion) in behandelten weiblichen Wildtyp-Mäusen ebenfalls eine erhöhte Expression auf. Eine AhR-vermittelte Induktion von *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Aldh3a1*, *Nqo1* sowie *Fmo3* wurde in mehreren Studien belegt (Alnouti und Klaassen, 2008; Hankinson, 1995; Nebert *et al.*, 2004, 2000; Tijet *et al.*, 2006; Vasiliou *et al.*, 1993). Die Gene *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp1b1* und *Cyp2b10* sind zusammen mit anderen Genen wie *Cidea*, *Fabp1* und *Fabp4*, wie in den eigenen *GO*-Analysen dieser Arbeit festgestellt wurde, auch in Prozesse des Lipidmetabolismus involviert. *Fabp1* und *Fabp4* zählen zur Familie der *fatty acid binding proteins*, die am Transport von Fettsäuren beteiligt sind (Chmurzyńska, 2006). Boverhof *et al.* konnte zeigen, dass *Fabp4* AhR-vermittelt durch TCDD (30 µg/kg KG) in den Lebern von

C57BL/6-Mäusen induziert wurde (Boverhof *et al.*, 2006). *Cidea* gehört zur Familie der CIDE (*cell death-inducing DFF45-like effector*), die als wichtige Regulatoren vieler Aspekte des Stoffwechsels wie z. B. Fetttröpfchen-Fusion und Fetteinlagerung in adipösem Gewebe bekannt sind. Lokalisiert ist *Cidea* an Lipid-Tröpfchen der Adipozten und an das endoplasmatische Retikulum von Hepatozyten (Gong *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008, 2014). Eine TCDD-vermittelte Induktion von *Cidea*, *Fabp1* und *Fabp4* in den Nieren wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Das Gen *Tdo2*, das die Tryptophan-2,3-Dioxygenase codiert, greift in den Metabolismus von organischen Säuren ein und wies sowohl in behandelten weiblichen Wildtyp-Mäusen wie auch in behandelten weiblichen Knockout-Mäusen eine erhöhte Expression im Microarray und in der RT-PCR auf. Induziert wird *Tdo2* durch Glucocorticoide wie Cortisol aber auch durch Glucagon und Dexamethason (Ishimura *et al.*, 1970; Nakamura *et al.*, 1987; Rubin, 1967). Über eine TCDD-induzierte Regulation der *Tdo2*-Expression in den Nieren wurde bisher nicht berichtet. Die eigenen Daten deuten auf eine AhR-unabhängige Regulierung der *Tdo2*-Expression hin.

Auffällig ist, dass in den 20 am häufigsten vorkommenden *GO terms* nur 63 der 152 hochregulierten Gene (41 %) und acht der 20 herunterregulierten Gene (40 %) in den verschiedenen *GO*-Gruppen involviert sind. Dies weist auf einen eher undifferenzierten TCDD-Response in den Nieren von Wildtyp-Mäusen hin und nicht auf eine Regulierung von Fremdstoff- und Lipidmetabolismus alleine.

Die *gene set enrichment*-Analyse der Genexpressionsmuster in den Nieren TCDD-behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse zeigte, dass vor allem Prozesse des blutbildenden Systems, der Blutgerinnung sowie der Biosynthese von Sterolen und des Katabolismus von organischen Säuren hochreguliert wurden. Herunterreguliert waren Prozesse des Lipidmetabolismus, der Biosynthese sowie des Metabolismus kleinerer Moleküle und des Metabolismus von Hormonen.

Gene wie *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2*, die in Prozesse des blutbildenden Systems involviert sind, zeigten im Microarray und zum Teil auch in der RT-PCR eine TCDD-vermittelte, signifikant erhöhte Expression in den Nieren behandelter weiblicher AhR-defizienter- und behandelter Wildtyp-Mäuse. Weitere Gene die in den Prozesse der Blutgerinnung involviert sind, wie *F10*, *Fgb* und *Fgg*, wiesen sowohl in behandelten weiblichen AhR-defizienten- wie auch in AhR-Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Expression in den Nieren auf. Die Daten lassen darauf schließen, dass die Regulierung dieser sieben Gene AhR-unabhängig erfolgt.

TCDD verminderte in den Nieren AhR-defizienter-Mäuse die Expression der Gene *Cidea* und *Fabp4* und erhöhte deren Expression in den Nieren TCDD-behandelter weiblicher Wildtyp-Mäuse. Dies kann als Indiz für eine AhR-abhängige Regulation von *Cidea* und *Fabp4* gewertet werden. Auch Boverhof *et al.* konnten in ihrer Studie die AhR-abhängige Regulation dieser Gene an C57BL/6-Mäusen nachweisen. TCDD (30 µg/kg KG) induzierte in dieser

Studie AhR-vermittelt *Fabp4* in den Lebern von Wildtyp-Mäusen (Boverhof *et al.*, 2006). Gegen eine AhR-abhängige Regulierung von *Fabp4* spricht jedoch die signifikant erhöhte Expression von *Fabp4* in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse, die im Microarray beobachtet wurden (Lohr, 2013).

Auffällig ist, dass in den *GO terms* der hochregulierten Gene nur 23 von 90 Genen (25,5 %) und bei den herunterregulierten Genen nur 72 von 235 Genen (30 %) vertreten sind. Dies weist eher auf einen undifferenzierten TCDD-Response hin und nicht auf die Regulierung eines spezifischen Signalweges durch TCDD.

Ausgewählte, im Microarray von behandelten Wildtyp- und Knockout-Mäusen regulierte Gene, wurden nun mittels RT-PCR verifiziert werden. Dazu sollte die im Western Blot beobachtete TCDD-vermittelte Induktion der Enzyme *Cyp1a1*, *Cyp1a2* und *Cyp1b1* sowie einiger anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie *Cyp2b10* und *Cyp3a44* (nur in den weiblichen Mäusen) in den Lebern, Nieren, Lungen und Milzen auf mRNA-Ebene überprüft werden.

Eine TCDD-vermittelte Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme *Cyp1a1*, *Cyp1b1* konnte in Leber, Niere und Lunge sowie eine Induktion von *Cyp1a2* in Leber und Niere weiblicher und männlicher Wildtyp-Mäuse beobachtet werden. Eine signifikant erhöhte *Cyp1b1*-Expression wurde ebenfalls in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse festgestellt. Möglicherweise ist der Östrogenrezeptor an der Transkription von *Cyp1b1* beteiligt, da er die basale *Cyp1b1*-Expression in transfizierten NHBE-Zellen (humane Bronchialepithelzellen) erhöhte (Han *et al.*, 2005). Damit könnte die Induktion von *Cyp1b1* in den Lebern weiblicher behandelter AhR-defizienter-Mäuse erklärt werden. *Cyp1a1* und *Cyp1a2* zeigten in keinem Organ AhR-defizienter-Mäuse eine erhöhte Expression auf. Dies konnte auch im EROD-Assay und den Western Blots bestätigt werden. Fernandez-Salguero *et al.* (1995) konnte ebenfalls keine *Cyp1a1*-Induktion in Leber, Niere und Lunge AhR-defizienter-Mäuse feststellen.

Die in den eigenen Untersuchungen im Microarray und der RT-PCR beobachtete erhöhte *Cyp2b10*-Expression in Leber und Niere behandelter weiblicher und männlicher Wildtyp-Mäuse lässt sich mit einer AhR-vermittelten Induktion des *constitutive androstane* Rezeptors (CAR) erklären. In einer Studie von Petrick *et al.* (2007) konnte an weiblichen und männlichen C57BL/6-Mäusen gezeigt werden, dass TCDD (37 µg/kg KG, intraperitoneal) CAR signifikant induzierte, was zu einem leichten Anstieg der *Cyp2b10*-Expression führte. In einer weiteren Untersuchung von Kopec *et al.* (2010) an weiblichen C57BL/6-Mäusen erhöhte TCDD (30 µg/kg KG, oral) leicht, aber nicht signifikant die Expression von *Cyp2b10*. Auffallend war in den eigenen Untersuchungen die signifikant erhöhte Expression von *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10* und *Cyp3a44* in den Milzen behandelter AhR-defizienter-Mäuse.

Die *AhR*-Genexpression in den bereits erwähnten Organen nach Behandlung mit TCDD wurde als nächstes überprüft. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass sowohl in Wildtyp-

Kontrollmäusen wie auch in AhR-defizienten-Kontrollmäusen *AhR*-mRNA vorhanden war. Durch Behandlung der Mäuse mit TCDD nahm die *AhR*-Expression in weiblichen und männlichen AhR-Wildtyp-Mäusen in den Nieren leicht, jedoch nicht signifikant zu. Eine signifikante Zunahme der *AhR*-Expression ist in den Lebern und Milzen der weiblichen AhR-Wildtyp-Mäuse zu beobachten. In den Lungen der Weibchen und Männchen dagegen nahm die Expression leicht ab. Durch Behandlung mit TCDD nahm die *AhR*-Expression in den untersuchten Organen weiblicher AhR-defizienter-Mäuse signifikant ab, mit einer Ausnahme. In den Lebern nahm die Expression des *AhR* nur leicht ab. In einigen Studien an Hepatitis C-Patienten wurde mit fortschreitender Leberfibrose eine verminderte *AhR*-Expression festgestellt (Hanada *et al.*, 2011).

Die in den eigenen Untersuchungen in den Lebern TCDD-behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse signifikant erhöhte Expression des Zytokins *IL-1 α* sowie eine leicht erhöhte Expression der Zytokine *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α* deutet auf eine akute Schädigung der Lebern hin. Es konnte in einer Studie von Ramadori und Armbrust (2001) gezeigt werden, dass aktivierte Kupfferzellen bei akuter Leberentzündung sowie bei Leberfibrose die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α* bewirken. Eine Studie von Pierre *et al.* (2014) belegte, dass TCDD in Wildtyp-Mäusen AhR-vermittelt die Expression von *IL-1 β* und *TNF- α* induzierte und Leberfibrose auslöste. In AhR-defizienten-Mäusen konnte dies nicht beobachtet werden (Pierre *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie von Gieling *et al.* (2009) wurde an zwei unterschiedlichen Mäusstämmen (C57BL/6 und BALB/c) ebenfalls nachgewiesen, dass in Thioacetamid (TAA)-induzierter Leberfibrose die Expression von *IL-1 α* und *IL-1 β* signifikant erhöht war (Gieling *et al.*, 2009). Berücksichtigt man die Ergebnisse der Literatur, so kann man daraus schließen, dass in den Lebern von behandelten AhR-defizienten-Mäusen eine Schädigung der Leber bzw. eine Leberfibrose durch TCDD induziert wurde.

Außerdem war in den Lebern TCDD-behandelter weiblicher AhR-Knockout-Mäuse eine signifikant verminderte Expression der Gene *Cyp1a1* und *Cyp3a44* sowie eine leichte Abnahme der *Cyp1a2*-Expression in der RT-PCR zu beobachten (Lohr, 2013). Eine signifikant verminderte *Cyp3a44*-Expression war auch in den behandelten weiblichen Wildtyp-Mäusen zu beobachten (Lohr, 2013). Die verminderte Expression dieser Gene könnte ebenfalls mit der erhöhten Zytokin-Expression in den Lebern zusammenhängen, da in einer Studie von Nakai *et al.* (2008) an HepG2-Zellen gezeigt werden konnte, dass die *CYP1A2*-Expression durch Behandlung der Zellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie *IL-1 β* und *IL-6* signifikant vermindert wurde. Ähnliches konnte an primären humanen Hepatozyten beobachtet werden. *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α* verminderten die Expression der Gene *CYP1A2* und *CYP3A4* (Nakai *et al.*, 2008). In einer Studie von Clark *et al.* an primären Rattenhepatozyten verminderten *IL-6*, *IL-1 α* und *IL-1 β* die durch 3-Methylcholanthren induzierte *Cyp1a1*/*Cyp1a2*-Aktivität (Clark *et al.*, 1995). In einer Studie von Peterson *et al.* wurde berichtet, dass die Expression von *Cyp1a* in AhR-defizienten-Mäusen aufgrund von Leberfibrose nicht detektierbar war (Peterson *et al.*, 2000).

Der verminderten Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1a2* in den Lebern behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse (eigene Experimente) war auch die verminderte Enzym-Aktivität im EROD-Assay in den Lebern der TCDD-behandelten weiblichen AhR-defizienten-Mäuse zuzuschreiben.

Die im Microarray (Lohr, 2013) und der RT-PCR erhöhte *Esm1*-Genexpression in den Lebern TCDD-behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse ist möglicherweise auf die erhöhte Expression von TNF- α zurückzuführen, da gezeigt werden konnte, dass TNF- α in humanen Endothelzellen die *Esm1*-Expression induzierte (Sarrazin *et al.* 2006). Das Proteoglykan *endothelial cell specific molecule 1* (*Esm1*) spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Stabilisierung von Blutgefäßen, der Proliferation von Endothelzellen, der Zelladhäsion sowie bei der Tumprogression (Abid *et al.*, 2006; Bechard *et al.*, 2000; Lassalle *et al.*, 1996; Sarrazin *et al.*, 2006). Eine ebenfalls erhöhte Expression von *Esm1* wurde in humanem und murinen hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet (Hoenerhoff *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2011).

Im Microarray war sowohl in TCDD-behandelten weiblichen AhR-defizienten-Mäusen als auch in behandelten weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen die Expression von *Coll1a1* (Kollagen 1 α) signifikant und *Acta2* (codiert α -smooth muscle actin/ α -SMA) leicht erhöht (Lohr, 2013). Beide Gene sind Biomarker für Leberfibrose (Pierre *et al.*, 2014). In einer Studie von Pierre *et al.* war die Expression von *Coll1a1* und *Acta2* in Wildtyp-Mäusen durch die mehrmalige Behandlung mit TCDD (25 μ g/kg KG pro Woche) nach zwei Wochen signifikant erhöht und eine mehrwöchige Behandlung mit TCDD führte zur Entwicklung einer Leberfibrose. Bei TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen konnte dies nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde in dieser Studie auch ein anderes AhR-Knockout-Modell verwendet (Pierre *et al.*, 2014).

In den Lebern TCDD-behandelter weiblicher AhR-Knockout-Mäuse konnte sowohl im Microarray (Lohr, 2013) als auch in der RT-PCR eine signifikant erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *c-Myc* beobachtet werden. Die leicht erhöhte Expression von Zytokinen in den Lebern von behandelten weiblichen AhR-Knockout-Mäusen könnte die Ursache für die *c-Myc*-Induktion in den Lebern behandelter weiblicher Knockout-Mäuse sein, da Zytokine wie z.B. TNF- α und einige Interleukine *c-Myc* induzieren (Levens, 2010; Straus, 2013). In Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose sowie in Patienten mit HCC wies *c-Myc* eine erhöhte Expression auf (Nevzorova *et al.*, 2013; Thorgeirsson and Grisham, 2002). Eine erhöhte *c-Myc*-Expression wurde auch in spontanen Leberzellkarzinomen in Mäusen festgestellt (Hoenerhoff *et al.*, 2011).

Darüber hinaus reguliert *c-Myc* eine Vielzahl weiterer Gene, unter anderem auch die Expression der Gene *Afp*, *Asns* und *E2f3* (Adams *et al.*, 2000; Mazure *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 2003). Eine signifikante Zunahme der Expression von *Afp* und *Asns* war durch Behandlung mit TCDD in den Lebern von weiblichen AhR-defizienten-Mäusen sowohl im Microarray (Lohr, 2013) als auch in der RT-PCR (eigene Untersuchungen) zu beobachten. Das Gen *Afp* (α -Fetoprotein) wird als Biomarker für HCCs angesehen und seine erhöhte

Expression korreliert mit aggressivem Tumorverhalten (Mitsuhashi *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010). In einer Studie von Kang *et al.* konnte auch eine TCDD-induzierte dosisabhängige Zunahme der *Afp*-Expression in HepG2-Zellen beobachtet werden (Kang *et al.*, 2005). Boverhof *et al.* zeigten, dass der *Asns*-Promotor drei DRE-Sequenzen zur Bindung des AhR besitzt (Boverhof *et al.*, 2006). Dies würde auf eine AhR-abhängige Regulierung hinweisen. Allerdings war nur im Microarray (Lohr, 2013) und der RT-PCR TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse (eigene Untersuchungen) eine erhöhte Expression in den Lebern zu beobachten. In weiteren Studien konnte dagegen belegt werden, dass c-Myc die Gentranskription von *Afp* durch Bindung an die AfP/HRE-Sequenz aktivieren (Mazure *et al.*, 2002). In humanen Hepatomzellen wurde die *Afp*-Genexpression durch Behandlung der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen *c-Myc* vermindert (Ebinuma *et al.*, 1999). O'Connell *et al.* konnten in einer Microarray-Analyse zeigen, dass die Expression von *Asns* durch c-Myc reguliert wird (O'Connell *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der RT-PCR (eigene Untersuchungen) und des Microarray (Lohr, 2013) wiesen auf eine AhR-unabhängige Regulierung der Expression hin. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass die Expression der Gene *Afp* und *Asns* AhR-abhängig oder -unabhängig durch den Transkriptionsfaktor c-Myc ablaufen kann.

Eine signifikant erhöhte *E2f3*-Expression in den Lebern war nur im Microarray behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse (Lohr, 2013) zu beobachten. In der RT-PCR war die Expression in den Lebern TCDD-behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse (eigene Untersuchungen) nur leicht erhöht. Der Transkriptionsfaktor E2f3 spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus beim Übertritt von der G₁- in die S-Phase (Chen *et al.*, 2009). Die Induktion von *E2f3* lässt vermuten, dass *E2f3* AhR-unabhängig und über den Transkriptionsfaktor c-Myc reguliert wird. Diese Ansicht wird auch durch die Studie von Adams *et al.* (2000) bekräftigt. Die Autoren zeigten, dass der *E2f3a*-Promotor mehrere c-Myc-Bindungsstellen aufweist, und dass in transfizierten REF52-Zellen (embryonale Ratten-Fibroblasten) c-Myc durch Bindung an den *E2f3a*-Promotor selbigen aktiviert (Adams *et al.*, 2000).

In zukünftigen Studien müsste eine mögliche Regulierung der Gene *Afp*, *Asns* und *E2f3* über den Transkriptionsfaktor c-Myc entweder *in vivo* mit AhR/c-Myc-Knockout-Mäusen oder *in vitro* durch AhR/c-Myc-Gen-Knockdown mittels siRNA untersucht werden.

Weitere Gene wie *Lpl*, *Igfbp1* und *Cdh1* wiesen sowohl im Microarray (Lohr, 2013) als auch in der RT-PCR (eigene Untersuchungen) in den Lebern behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse aber zum Teil auch in den Lebern behandelte AhR-Wildtyp-Mäuse eine erhöhte Expression auf. Die Lipoprotein-Lipase (Lpl) katalysiert zum einen die Hydrolyse von Triglyceriden, zum anderen dient Lpl als Ligand/Bindungs-Faktor für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen (Mead *et al.* 2002). *Igfbp1* gehört zur Familie der *insulin-like growth factor-binding-proteins* (IGFBP), die eine hohe Affinität für IGF-I und -II besitzen und somit den Level des freien IGF reguliert (Firth und Baxter, 2002). In einer Studie von Boverhof *et al.* (2006) induzierte TCDD (30 µg/kg KG) AhR-vermittelt *Igfbp1* in den

Lebern von Wildtyp-Mäusen. Weiter wurde berichtet, dass im *Igfbp1*-Promotor neun DRE-Sequenzen zur Bindung des AhR vorhanden sind (Boverhof *et al.*, 2006). Allerdings konnte auch eine IL-6-vermittelte Induktion von *Igfbp1* in primären Rattenhepatozyten beobachtet werden (Lelbach *et al.*, 2001). Die Regulierung der Expression von *Igfbp1* durch IL-6 würde möglicherweise die Induktion von *Igfbp1* in den Lebern weiblicher TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse der eigenen Untersuchungen erklären, da IL-6 in den Lebern TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse in geringem Ausmaß induziert wurde (eigene Untersuchungen). E-Cadherin (*Cdh1*), das auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, ist eines der wichtigsten Zelladhäsionsmoleküle im Epithelgewebe. *Cdh1* beeinflusst Zellreaktionen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Ein Funktionsverlust korreliert mit dem Auftreten invasiver Tumore und Metastasenbildung (Barth *et al.*, 1997; Pećina-Slaus, 2003). In B6C3F1-Mäusen mit spontanen HCC konnte eine erhöhte Expression von *Afp*, *Esm1*, *Lpl*, *Igfbp1* und *Cdh1* festgestellt werden (Hoenerhoff *et al.*, 2011). *Afp*, *Anxa1*, *Asns*, *Esm1* und *E2f3* wiesen im Lebergewebe von HCC-Patienten ebenfalls eine erhöhte Expression auf (Kang *et al.*, 2011; Masaki *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013).

Anxa1 spielt eine wichtige Rolle im malignen Transformationsprozess, der zur Bildung von Leberzellkarzinomen führt (Masaki *et al.*, 1996). *Asns* (Asparagin-Synthetase) wies auch im Lebergewebe von HCC-Patienten eine erhöhte Expression auf und korrelierte mit einer kleinen Tumorgroße und einem frühen Tumorstadium, während eine verminderte *Asns*-Expression auf einen großen Tumor und ein fortgeschrittenes Tumorstadium hinwies (Zhang *et al.*, 2013).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die signifikant erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins *IL-1 α* , des Fibrosemarkers *Colla1* und des Protoonkogens *c-Myc* sowie die signifikant verminderte Expression von *Cyp1a1* und *Cyp3a44* in den Lebern von TCDD-behandelten weiblichen AhR-defizienten-Mäusen auf eine Leberentzündung sowie eine Leberfibrose hindeuten. Außerdem sind die leicht erhöhte Expression der Zytokine *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α* sowie des Fibrosemarkers *Acta2* und die leicht verminderte Expression von *Cyp1a2* und *AhR* in den Lebern von TCDD-behandelten weiblichen AhR-defizienten-Mäusen weitere Indizien für eine Fibrose. Da sich im Portaltrakt der Lebern AhR-defizienter-Mäusen schon drei Wochen nach der Geburt eine ausgeprägte Fibrose manifestierte (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995), könnte die TCDD-Behandlung der AhR-defizienten-Mäuse der (eigenen Untersuchungen) zur weiteren Stimulierung der vorhandenen Fibrose führen. Da *Afp* und *Esm1* als Biomarker für HCCs angesehen werden (Kang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013) und die Gene *Anxa1*, *Asns* sowie *E2f3* in HCC-Patienten eine erhöhte Expression aufwiesen (Masaki *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 2014), könnte die Zunahme der Expression der Gene *Afp*, *Anxa1*, *Asns*, *Cdh1* und *Esm1* in den Lebern von TCDD-behandelten weiblichen AhR-defizienten-Mäusen (eigene Experimente) auf die Bildung von Leberzellkarzinomen hinweisen.

Um zu überprüfen ob eine Leberentzündung bzw. -fibrose mit Übergang zum Leberkarzinom vorhanden ist, sollten in Zukunft zusätzliche Studien mit einer höheren Tierzahl durchgeführt werden und weitere Biomarker für Leberfibrose und HCC untersucht werden. Ebenso könnte eine histologische Untersuchung des Lebergewebes zur weiteren Aufklärung der möglichen Entstehung von Leberfibrose und HCC in den TCDD-behandelten AhR-defizienten-Mäusen beitragen. Des Weiteren sollte die Konzentration von freigesetzten, pro-inflammatorischen Zytokine (*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α*) mittels *enzyme-linked immunosorbent* (ELISA)-Assays bestimmt werden.

Wie die eigenen Ergebnisse zeigen, wiesen die Gene *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* in den Nieren behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse in der RT-PCR und zum Teil im Microarray eine signifikant erhöhte Expression auf. Eine Überexpression des Gens *Cyp24a1* konnte in verschiedenen humanen Tumoren wie z. B. in Lunge und Dickdarm sowie Niere festgestellt werden. Die Überexpression von *Cyp24a1* wird dabei als Biomarker für eine ungünstige Krebs-Prognose angesehen (Anderson *et al.*, 2006; Urbschat *et al.*, 2013). Sowohl *Cyp24a1* als auch *Cyp27b1* werden über den *VDR* reguliert (Dusso *et al.*, 2005). Dies deutet auf eine Aktivierung des *VDR* in den Nieren behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse (eigene Untersuchungen) hin. Eine synergistische Wirkung von Calcitriol und TCDD auf die *Cyp24a1*-Expression in AhR-defizienten Mäusen, wie sie von Matsunawa *et al.* in THP-1 Zellen beobachtet wurde, kann in den eigenen Experimenten ausgeschlossen werden, da eine synergistische Wirkung erst ab einer Calcitriol-Konzentration von 10 nM beobachtet wurde (Matsunawa *et al.*, 2009). Nach einer Studie von Chow *et al.* (2013) beträgt die basale Calcitriol-Konzentration in den Nieren unbehandelter C57BL/6-Mäuse $70,5 \pm 10,4$ pM (Chow *et al.*, 2013) und liegt somit unterhalb der Calcitriol-Mindestkonzentration von 10 nM für einen synergistischen Effekt (Matsunawa *et al.* 2009). Einen weiteren Hinweis für die Aktivierung des *VDR* in den Nieren behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse könnte die verminderte Expression von *c-Myc* in den Nieren behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse (eigene Experimente) sein. Da in einer Studie von Salehi-Tabar *et al.* *in vitro* an HL60- und SCC25- Zellen gezeigt werden konnte, dass *VDR* die *c-Myc*-Expression und Funktion in Anwesenheit von Calcitriol über verschiedene Mechanismen unterdrückte (Salehi-Tabar *et al.*, 2012). Rohan und Weigel (2009) konnten in humanen Prostatakrebszellen (C4-2 Zellen) ebenfalls beobachten, dass Calcitriol die *c-Myc*-Expression verminderte. Die in den eigenen Experimenten beobachtete reduzierte *c-Myc*-Expression in den Nieren behandelte weiblicher AhR-defizienter Mäuse würde auch die verminderte bzw. unveränderte Expression von *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Nieren der behandelte weiblichen AhR-defizienten-Mäuse erklären, da *c-Myc* die Expression von *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* regulieren kann (Adams *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Mazure *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 2003). Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete erhöhte Expression von *Cyp24a1*, *Cyp27b1* und *VDR* sowie die verminderte bzw. kaum veränderte Expression von *c-Myc*, *Afp*, *Asns*, *E2f3* und *Pla2g4a* in den Nieren TCDD-behandelte weiblicher AhR-defizienter-Mäuse deutet auf die Aktivierung

des VDR hin. Inwieweit der VDR durch Bindung von TCDD oder durch Cross-Talk mit dem AhR aktiviert wird, ist bisher unbekannt. Eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine in den Nieren behandelter AhR-defizienter Mäuse könnte möglicherweise für die erhöhte Expression von *Cyp24a1* und *Cyp27b1* verantwortlich sein. Darauf weist eine Studie von Noyola- Martínez *et al.* (2013) hin, in der gezeigt werden konnte, dass *IL-1 α* , *IL-1 β* und *TNF- α* in Trophoblasten die Expression von *Cyp24a1* und *Cyp27b1* induzierte. Im eigenen Microarray der Nieren behandelter weiblicher AhR-defizienter-Mäuse konnte eine minimal erhöhte Expression der Zytokine *IL-1 α* , *IL-1 β* und *TNF- α* beobachtet werden. Die erhöhte *VDR*-Expression in den Nieren behandelter AhR-defizienter-Mäuse (eigene Experimente) spricht jedoch gegen eine Regulierung der *Cyp24a1* und *Cyp27b1*-Expression durch die Zytokine *IL-1 α* , *IL-1 β* und *TNF- α* , da in einer Studie von Xiong *et al.* in Epithelzellen des proximalen Tubulus (HK-2) durch Behandlung mit *TNF- α* eine verminderte *VDR*-Expression beobachtet wurde (Xiong *et al.*, 2012). Möglicherweise wird der VDR jedoch über einen Cross-Talk zwischen AhR und RXR (einem Dimierisierungspartner des VDR) aktiviert. In der Literatur wurden bereits Hinweise auf eine Interaktion zwischen AhR und RXR gefunden (Murphy *et al.*, 2007; Nilsson und Håkansson, 2002).

Eine mögliche Induktion dieser Zytokine in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse könnte in zukünftigen Studien nachgegangen werden. Ebenso sollte eine mögliche Aktivierung des VDR durch Bindung von TCDD oder durch einen möglichen Cross-Talk zwischen VDR und AhR sowie AhR und RXR in weitergehenden Studien näher betrachtet werden.

Der im Microarray festgestellte positive Einfluss von TCDD auf Prozesse der Entwicklung von Erythrozyten, der Triglyceridbiosynthese und -bindung sowie der Regulierung der Prostaglandin-Biosynthese in den Lebern von behandelten AhR-defizienten-Mäusen (Lohr, 2013) sollte mittels RT-PCR bestätigt werden. Hierfür wurde die Genexpression der in die entsprechenden Prozesse involvierten Gene *Lpl*, *Hba-a2*, *Hbb-b1*, *Hbb-b2* sowie *Anxa1* und *Pla2g4a* in den Lebern gemessen. *Lpl* spielt eine Rolle in der Biosynthese von Triglyceriden und weist sowohl in behandelten weiblichen AhR-Wildtyp- wie auch AhR-defizienten-Mäusen eine signifikant erhöhte Expression auf. Dies deutet auf eine AhR-unabhängige Regulierung von *Lpl* hin, obwohl in dessen Promotor zwei DRE-Sequenzen zur Bindung des AhR zu finden sind und es gezeigt werden konnte, dass TCDD AhR-vermittelt *Lpl* induzierte (Minami *et al.*, 2008).

Die Gene *Hba-a2*, *Hbb-b1* und *Hbb-b2* sind in der Entwicklung von Erythrozyten involviert und wiesen in den Lebern TCDD-behandelter weiblicher und männlicher AhR-defizienter-Mäuse eine leichte Zunahme der Expression auf. In TCDD-behandelten weiblichen Wildtyp-Mäusen war eine geringe Zunahme von *Hba-a2* und eine leichte Abnahme von *Hbb-b1* und *Hbb-b2* zu beobachten. Eine TCDD-vermittelte Induktion dieser Gene wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, aber die eigenen Daten deuten auf eine AhR-unabhängige Regulierung der Expression dieser Gene hin.

An der Prostaglandin-Biosynthese sind die Gene *Anxa1* und *Pla2g4a* beteiligt und wiesen eine TCDD-vermittelte Induktion in den Lebern von weiblichen AhR-Knockout-Mäusen auf. Dies deutet auf eine AhR-unabhängige Regulierung der Gene hin, obwohl in einer Studie von Kinehara *et al.* (2008) gezeigt werden konnte, dass TCDD in Hepa-1c1c7 Zellen AhR-vermittelt *Pla2g4a* induzierte.

4.9.4 Metabolomics

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Metabolomics-Analyse zur Etablierung einer AhR-Metabolomics-Plattform durchgeführt, um die Gesamtheit der erfassbaren Veränderungen des endogenen Metabolitenspektrums in weiblichen AhR-defizienten-Mäusen sowie Wildtyp-Mäusen mit und ohne TCDD-Behandlung aufzuklären.

Hierfür wurde das Blut mit SPE-Säulen aufgearbeitet, chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch untersucht (HPLC-MS/MS). Zusammenfassend kann man feststellen, dass im Vollblut eine Reihe ausgeprägter Unterschiede im Aminosäurehaushalt von weiblichen AhR-Wildtyp- und AhR-defizienten-Mäusen zu erkennen waren, die sich nach TCDD-Behandlung veränderten.

In Kontrolltieren war in den Vollblutproben von weiblichen AhR-Wildtyp-Mäusen eine höhere Tyrosin-Konzentration im Plasma vorhanden als in den weiblichen AhR-defizienten-Mäusen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Dagegen war nach TCDD-Behandlung eine signifikant höhere Tyrosin-Plasmakonzentration in AhR-defizienten-Mäusen zu beobachten im Vergleich zu den AhR-Wildtyp-Mäusen. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen waren auf für die Aminosäuren Phenylalanin und Leucin zu verzeichnen. In Wildtyp-Mäusen war durch die TCDD-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Plasmakonzentration von Leucin vorhanden. Andererseits war in behandelten AhR-defizienten-Mäusen im Vergleich zu behandelten Wildtyp-Mäusen eine signifikant höhere Phenylalanin-Konzentration im Plasma zu beobachten. Die Ergebnisse weisen auf eine funktionelle Rolle des AhR im Aminosäurestoffwechsel hin. Es wäre daher notwendig, in zukünftigen Experimenten den gesamten Aminosäurestoffwechsel näher zu untersuchen, da in dieser Arbeit nur wenige lipophile Aminosäuren detektiert, identifiziert und teilweise quantifiziert werden konnten.

Geringe, allerdings nicht signifikante Unterschiede konnten auch im Tryptophan-Metabolismus registriert werden. Im Blut TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse war ein höherer Gehalt von Tryptophan und Serotonin vorhanden. Im Hinblick auf die hier nicht abschließend zu beantwortende Frage, inwieweit der AhR den Tryptophan-Metabolismus beeinflusst, sollte dieser in künftigen Untersuchungen etwas näher beleuchtet werden.

Unter den nicht zugeordneten Massen sind einige signifikante, aber auch hochsignifikante Unterschiede zwischen den Genotypen aber auch zwischen den Kontrollen und den Behandlungsgruppen zu beobachten. Um in Zukunft weitere Metaboliten identifizieren zu können, sollte zunächst eine Datenbank mit Fragmentierungsmustern, der natürlich im Blut

vorkommenden Substanzen, erstellt werden. Außerdem sollten nach der Identifizierung einzelner Metaboliten, *multiple reaction monitoring* (MRM)-Messungen zur sensitiveren Quantifizierung der einzelnen Metaboliten durchgeführt werden.

5. Materialien

5.1 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller / Vertrieb
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt, Germany
Acetonitril (HPLC Grade)	Merck, Darmstadt, Germany
Acrylamide-Mix (rotiphorese 30)	Roth, Karlsruhe, Germany
Anthranilsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
APS	Merck, Darmstadt, Germany
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Germany
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Germany
Bovine Serum Albumin (BSA) 30%	PAA, Cölbe, Germany
Chloroform	Merck, Darmstadt, Germany
Collagenase (100CDU/ml)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm, Germany
DMEM high glucose (4,5 g/l) ohne Phenolrot	PAA, Cölbe, Germany
DMEM low glucose (1 g/l) mit Phenolrot	PAA, Cölbe, Germany
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe, Germany
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Germany
Ethylenglycol-bis(β)-Aminoethylether-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt, Germany
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe, Germany

Glucose	Merck, Darmstadt, Germany
β -Glucuronidase	Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Glycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Ham's F12 ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin	PAA, Cölbe, Germany
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	PAA, Cölbe, Germany
Heparin (1000 U/ml)	Serva, Heidelberg, Germany
HEPES	Roth, Karlsruhe, Germany
H ₂ O ₂ - Lösung (30%)	Applichem, Darmstadt, Germany
Insulin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad GmbH, München, Germany
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt, Germany
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Germany
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Germany
Khellin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Linolsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Luminol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, Germany
MassRuler Low Spannweite DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol (HPLC-Grade)	Merck, Darmstadt, Germany
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Germany
Milchpulver	Spinnrad GmbH, Gelsenkirchen, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Germany
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumhydrogenphosphat (NaHPO ₄ x 4 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
<i>p</i> -Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany

PCR-Mastermix (2x)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Germany
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Percoll	GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Finland
Polypropylenglykol (PPG)-Standards	AB Sciex, Darmstadt, Germany
Precision ± Protein™ Kaleidoscope™	Bio-Rad GmbH, München, Germany
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany
Resorufin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
SDS	Merck, Darmstadt, Germany
2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -Dioxin (TCDD)	AccuStandard, New Haven, CT, USA
TEMED	Serva, Heidelberg, Germany
Transferrin (5 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Tris	Roth, Karlsruhe, Germany
TRIzol Reagent	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Trypsin/EDTA (1:250) - Lösung	PAA, Cölbe, Germany
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany

5.2 Kits

In der folgenden Liste sind sämtliche in der Dissertation verwendeten Kits aufgelistet.

Kit	Hersteller / Vertrieb
E. Z. N. A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek)	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Venlo, Netherlands
BCA™ Protein Assay Kit (Pierce)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
iScript cDNA synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Low Input Quick Amp Labeling Kit, Two-Color	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
RNA Spike-In Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
RNA 6000 Pico LabChip Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany

5.3 Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Liste sind sämtliche in der Dissertation verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
60 mm – Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
6-Well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Cryo.s TM Tubes (2 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Deckelstreifen für PCR-Tubes 8-Strip gewölbt/flach	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Einmalpipetten (5 /10 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Falcon (15/50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Filter cap Kulturf Flasche (75 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Filterspitzen	Mettler- Toledo GmbH, Gießen, Germany
Immun-Blot PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
PCR-Tubes 8-Strip 0,1 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Reaktionsgefäße (0,2 / 1,5 / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Rotilabo®- Spritzefilter PVDF (0,22 µm)	Roth, Karlsruhe, Germany
SPE-Säule Chromabond HR-X (200mg/3ml)	Roth, Karlsruhe, Germany
Spritze (1ml)	Terumo, Eschborn, Germany
Sterican Einmalkanüle (26G)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
Whatman TM Chromatography paper (3 mm)	GE Healthcare, München, Germany
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany

5.4 Geräteliste

Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Germany
	UNOLD Electro	UNOLD, Hockenheim, Germany
Bioanalyzer	Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
Biofreezer	MDF-U6086S	Sanyo, München, Germany
Blotting Apparatur	Semi-dry blotter TE 77	Hoefer Inc., San Francisco, CA, USA
Brutschrank	Heraeus B5060 E CO2	Heraeus, Hanau, Germany
	Köttermann 2737	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen, Germany
Cycler	CFX96 Touch™ MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Eagle Eye	Eagle EYE II Cabinet	Stratagene, Amsterdam, Netherlands
Gelkammer	Mini Protean III Apparatus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, Germany
Homogenisator	RZ R2 100	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Germany
	Homogenizer ultrasonic needle	BiBraun, Melsungen, Germany
HPLC-ESI-MS/MS	Massenspektrometer API 2000	AB Sciex, Darmstadt, Germany
	PerkinElmer Series 2000	PerkinElmer, Rodgau, Germany
	PerkinElmer Ultraviolet detector 785 A	PerkinElmer, Rodgau, Germany
Inkubator	BBD6220 Heraeus	Heraeus, Hanau, Germany
Kühl-/Gefrierschrank	Liebherr	Liebherr, Karlsruhe, Germany
	Philips	Phillips, Herrsching, Germany
Lumi Imager	LumiImager	Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Germany
Microarray Scanner	Microarray scanner B G2505	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany

Mikroskope	Leica DM IRB	Leica, Wetzlar, Germany
Multipette	Multipette ® (Research ±, Eppendorf)	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter	pH meter	Eutech Instruments Europe B.V. AG Nijkerk, Netherlands
Pipetten	Eppendorf Research	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
	Pipetman Gilson	VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
	Pipetus® accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany
Plate Reader	Fluoroscan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	MWGt Sirius HT Injector	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Schüttler	Shaker PMS-1000	Grant-bio Ltd., Cambridgeshire, United-Kingdom
Spannungsgerät	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
	Power Supply ST 305	Gibco BRL, Eggenstein, Germany
Sterilbank	BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim, Germany
	Safety workbench MRF-B	Steag Laminarflow-Prozestechnik, Pfullingen, Germany
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Ultraschall-Homogenisator	Ultrasonic probe Sono±	Bandelin electronics GmbH & Co. KG, Berlin, Germany
Vortex	Vortex Relax 2000	Heidolph, Frankfurt/Main, Germany
Wasserbad	GFL 1083	GFL, Burgwedel, Germany
	Julabo 13	Julabo, Seelbach, Germany
Zählkammer	Neubauer Counting Chamber	Roth, Karlsruhe, Germany
	Fuchs-Rosenthal Counting Chamber	Roth, Karlsruhe, Germany
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Germany
	Microfuge R	Beckman Coulter, Krefeld, Germany

Rotina 35

Sigma 1-13

Sigma 1 L-12

Ultracentrifuge Optima TL

Hettich GmbH & Co. KG,
Tuttlingen, Germany

Sigma Laboratory centrifuges
GmbH, Osterode, Germany

Sigma Laboratory centrifuges
GmbH, Osterode, Germany

Beckman Coulter, Krefeld,
Germany

6. Literaturverzeichnis

- Abid, M.R., Yi, X., Yano, K., Shih, S.-C., Aird, W.C., 2006. Vascular endocan is preferentially expressed in tumor endothelium. *Microvasc. Res.* 72, 136–45. doi:10.1016/j.mvr.2006.05.010
- Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., Nevins, J.R., 2000. Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3633–9. doi:10.1128/MCB.20.10.3633-3639.2000.Updated
- Adamsson, a, Simanainen, U., Viluksela, M., Paranko, J., Toppari, J., 2009. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on foetal male rat steroidogenesis. *Int. J. Androl.* 32, 575–85. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00900.x
- Ahonen, M.H., Zhuang, Y.H., Aine, R., Ylikomi, T., Tuohimaa, P., 2000. Androgen receptor and vitamin D receptor in human ovarian cancer: growth stimulation and inhibition by ligands. *Int. J. Cancer* 86, 40–6.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., 2009. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10.Auflage ed. Elsevier GmbH München.
- Albertson, D.G., Ylstra, B., Segraves, R., Collins, C., Dairkee, S.H., Kowbel, D., Kuo, W.L., Gray, J.W., Pinkel, D., 2000. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat. Genet.* 25, 144–6. doi:10.1038/75985
- Alexa, A., Rahnenführer, J., Lengauer, T., 2006. Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* 22, 1600–7. doi:10.1093/bioinformatics/btl140
- Alitalo, K., Bishop, J.M., Smith, D.H., Chen, E.Y., Colby, W.W., Levinson, A.D., 1983. Nucleotide sequence to the v-myc oncogene of avian retrovirus MC29. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 100–4.
- Alnouti, Y., Klaassen, C.D., 2008. Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicol. Sci.* 101, 51–64. doi:10.1093/toxsci/kfm280
- Amara, I.E. a, Anwar-Mohamed, A., Abdelhamid, G., El-Kadi, A.O.S., 2012. Effect of mercury on aryl hydrocarbon receptor-regulated genes in the extrahepatic tissues of C57BL/6 mice. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2325–34. doi:10.1016/j.fct.2012.04.028
- Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I., Land, H., 1993. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233–45.
- Amati, B., Dalton, S., Brooks, M.W., Littlewood, T.D., Evan, G.I., Land, H., 1992. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359, 423–6. doi:10.1038/359423a0
- Anderson, M.G., Nakane, M., Ruan, X., Kroeger, P.E., Wu-Wong, J.R., 2006. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57, 234–40. doi:10.1007/s00280-005-0059-7
- Andersson, K., Chen, D., Mattsson, H., Sundler, F., Håkanson, R., 1999. Physiological significance of ECL-cell histamine. *Yale J. Biol. Med.* 71, 183–93.
- Andreola, F., Fernandez-Salguero, P.M., Chiantore, M. V, Petkovich, M.P., Gonzalez, F.J., De Luca, L.M., 1997. Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.* 57, 2835–8.
- Andreola, F., Hayhurst, G.P., Luo, G., Ferguson, S.S., Gonzalez, F.J., Goldstein, J. a, De Luca, L.M., 2004. Mouse liver CYP2C39 is a novel retinoic acid 4-hydroxylase. Its down-regulation offers a molecular basis for liver retinoid accumulation and fibrosis in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Biol. Chem.* 279, 3434–8. doi:10.1074/jbc.M305832200
- Angrish, M.M., Dominici, C.Y., Zacharewski, T.R., 2013. TCDD-elicited effects on liver, serum, and adipose lipid composition in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 131, 108–15. doi:10.1093/toxsci/kfs277

- Angrish, M.M., Mets, B.D., Jones, A.D., Zacharewski, T.R., 2012. Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 128, 377–86. doi:10.1093/toxsci/kfs155
- Anwar-Mohamed, A., Abdelhamid, G., Amara, I.E. a, El-Kadi, A.O.S., 2012. Differential modulation of aryl hydrocarbon receptor regulated enzymes by arsenite in the kidney, lung, and heart of C57BL/6 mice. *Arch. Toxicol.* 86, 897–910. doi:10.1007/s00204-012-0855-x
- Assem, M., Schuetz, E.G., Leggas, M., Sun, D., Yasuda, K., Reid, G., Zelcer, N., Adachi, M., Strom, S., Evans, R.M., Moore, D.D., Borst, P., Schuetz, J.D., 2004. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 279, 22250–7. doi:10.1074/jbc.M314111200
- Axelrod, J., 1962. Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *J. Biol. Chem.* 237, 1657–60.
- Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., 2005. Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10040–51. doi:10.1128/MCB.25.22.10040-10051.2005
- Balasubramanian, M.N., Butterworth, E. a, Kilberg, M.S., 2013. Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E789–99. doi:10.1152/ajpendo.00015.2013
- Ballschmiter, K., Bacher, R., 1996. Dioxine Chemie, Analytik, Vorkommen, Umweltverhalten und Toxikologie der halogenierten Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane. VCH-Verlagsgesellschaft.
- Barth, A.I., Näthke, I.S., Nelson, W.J., 1997. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 683–90.
- Baudino, T.A., Cleveland, J.L., 2001. The Max network gone mad. *Mol. Cell. Biol.* 21, 691–702. doi:10.1128/MCB.21.3.691
- Becharard, D., Meignin, V., Scherpereel, a, Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, a, Tonnel, a, Lassalle, P., 2000. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J. Vasc. Res.* 37, 417–25. doi:25758
- Beebe, L.E., Fornwald, L.W., Diwan, B.A., Anver, M.R., Anderson, L.M., 1995. Promotion of N-nitrosodiethylamine-initiated hepatocellular tumors and hepatoblastomas by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or Aroclor 1254 in C57BL/6, DBA/2, and B6D2F1 mice. *Cancer Res.* 55, 4875–80.
- Beischlag, T. V, Luis Morales, J., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H., 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 207–50.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B*, 289–300.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2003. *Biochemie*, 5. Auflage ed. Spectrum Lehrbücher.
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905. doi:10.1038/nature08822
- Bfr, 2011. Kein gesundheitliches Risiko durch den Verzehr von Eiern und Fleisch auf der Basis aktuell ermittelter Dioxingehalte 1–15.
- Bhadhprasit, W., Sakuma, T., Hatakeyama, N., Fuwa, M., Kitajima, K., Nemoto, N., 2007. Involvement of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor in the regulation of mouse CYP3A44 female-predominant expression by glucocorticoid hormone. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1880–5. doi:10.1124/dmd.107.016832
- Birnbaum, L.S., 1994. The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl, 157–67.
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., Bradfield, C.A., 1991. Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9543–7.

- Blackwood, E.M., Luscher, B., Eisenman, R.N., 1992. Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev.* 6, 71–80. doi:10.1101/gad.6.1.71
- Blake, P.G., Madrenas, J., Halloran, P.F., 1993. Ly-6 in kidney is widely expressed on tubular epithelium and vascular endothelium and is up-regulated by interferon gamma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 1140–50.
- Bloomston, M., Zhou, J.X., Rosemurgy, A.S., Frankel, W., Muro-Cacho, C.A., Yeatman, T.J., 2006. Fibrinogen gamma overexpression in pancreatic cancer identified by large-scale proteomic analysis of serum samples. *Cancer Res.* 66, 2592–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3659
- Bock, K.W., Köhle, C., 2005. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol.* 400, 57–75. doi:10.1016/S0076-6879(05)00004-2
- Bock, K.W., Köhle, C., 2006. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem. Pharmacol.* 72, 393–404. doi:10.1016/j.bcp.2006.01.017
- Bothwell, M., 1996. p75NTR: a receptor after all. *Science* 272, 506–7.
- Boutros, P.C., Bielefeld, K. a, Pohjanvirta, R., Harper, P. a, 2009. Dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries: comparison of liver and kidney in AHR-null mice. *Toxicol. Sci.* 112, 245–56. doi:10.1093/toxsci/kfp191
- Boverhof, D.R., Burgoon, L.D., Tashiro, C., Sharratt, B., Chittim, B., Harkema, J.R., Mendrick, D.L., Zacharewski, T.R., 2006. Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 94, 398–416. doi:10.1093/toxsci/kfl100
- Bradfield, C.A., Glover, E., Poland, A., 1991. Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor from the C57BL/6J mouse. *Mol. Pharmacol.* 39, 13–9.
- Braeuning, A., Köhle, C., Buchmann, A., Schwarz, M., 2011. Coordinate regulation of cytochrome P450 1a1 expression in mouse liver by the aryl hydrocarbon receptor and the beta-catenin pathway. *Toxicol. Sci.* 122, 16–25. doi:10.1093/toxsci/kfr080
- Brown, R.E., Jarvis, K.L., Hyland, K.J., 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* 180, 136–9.
- Brzezinski, M.R., Spink, B.J., Dean, R.A., Berkman, C.E., Cashman, J.R., Bosron, W.F., Biochemistry, D., B, M.B.M.R., 1997. Human liver carboxylesterase hCE-1: binding specificity for cocaine, heroin, and their metabolites and analogs. *Drug Metab Dispos* Sept. 1 25, 1089–1096.
- Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2007. Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metab. Dispos.* 35, 121–7. doi:10.1124/dmd.106.012070
- Buckley, D.B., Klaassen, C.D., 2009. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor e. *Drug Metab. Dispos.* 37, 847–56. doi:10.1124/dmd.108.024190
- Bui, P., Solaimani, P., Wu, X., Hankinson, O., 2012. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment alters eicosanoid levels in several organs of the mouse in an aryl hydrocarbon receptor-dependent fashion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 143–51. doi:10.1016/j.taap.2011.12.009
- Cammann, K., 2001. *Instrumentelle Analytische Chemie*, 1.Auflage ed. Springer Akademischer Verlag.
- Capaldi, R.A., 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 569–96. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.003033
- Casaccia-Bonnet, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., Chao, M. V, 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383, 716–9. doi:10.1038/383716a0
- Cashman, J.R., 2002. Human flavin-containing monooxygenase (form 3): polymorphisms and variations in chemical metabolism. *Pharmacogenomics* 3, 325–39. doi:10.1517/14622416.3.3.325

- Chahoud, I., Krowke, R., Schimmel, A., Merker, H.J., Neubert, D., 1989. Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. I. Effects of high doses on the fertility of male rats. *Arch. Toxicol.* 63, 432–9.
- Chan, L.F., Webb, T.R., Chung, T.-T., Meimaridou, E., Cooray, S.N., Guasti, L., Chapple, J.P., Egertová, M., Elphick, M.R., Cheetham, M.E., Metherell, L. a, Clark, A.J.L., 2009. MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6146–51. doi:10.1073/pnas.0809918106
- Chen, H.-M., Lee, Y.-H., Chen, R.-J., Chiu, H.-W., Wang, B.-J., Wang, Y.-J., 2013. The immunotoxic effects of dual exposure to PCP and TCDD. *Chem. Biol. Interact.* 206, 166–74. doi:10.1016/j.cbi.2013.09.005
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., Leone, G., 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* 9, 785–97. doi:10.1038/nrc2696
- Cheng, S.W., Davies, K.P., Yung, E., Beltran, R.J., Yu, J., Kalpana, G. V, 1999. c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat. Genet.* 22, 102–5. doi:10.1038/8811
- Chmurzyńska, A., 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* 47, 39–48. doi:10.1007/BF03194597
- Choi, J., Ishida, M., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., 2008. Involvement of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the maintenance of pregnancy in mice. *J. Reprod. Dev.* 54, 408–12.
- Choi, S.S.H., Miller, M. a, Harper, P. a, 2006. In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces amphiregulin gene expression in the developing mouse ureter. *Toxicol. Sci.* 94, 163–74. doi:10.1093/toxsci/kfl090
- Chow, E.C.Y., Quach, H.P., Vieth, R., Pang, K.S., 2013. Temporal changes in tissue 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after 1,25(OH)₂D₃ treatment in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E977–89. doi:10.1152/ajpendo.00489.2012
- Christakos, S., Dhawan, P., Shen, Q., Peng, X., Benn, B., Zhong, Y., 2006. New insights into the mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25dihydroxyvitamin D₃. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068, 194–203. doi:10.1196/annals.1346.025
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Wang, T.T., Yeh, G.C., 1998. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 56, 197–206.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C., 1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* 340 (Pt 3, 715–22.
- Clark, M. a, Bing, B. a, Gottschall, P.E., Williams, J.F., 1995. Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 97–104.
- Cole, M.D., Cowling, V.H., 2008. Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 810–5. doi:10.1038/nrm2467
- Coller, H. a, Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., Golub, T.R., 2000. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3260–5.
- Cornell, D.W., 2005. *Basic Concepts of Environmental Chemistry*, Second Edi. ed. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., Croce, C.M., 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7824–7.
- Dang, C. V, Lee, W.M., 1988. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4048–54.
- Dang, C. V, O'Donnell, K. a, Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., Li, F., 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–64. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.014
- Danser, a H.J., Deinum, J., 2005. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* 46, 1069–76. doi:10.1161/01.HYP.0000186329.92187.2e

- Davis, R.L., Homer, V.M., George, P.M., Brennan, S.O., 2009. A deep intronic mutation in FGB creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Hum. Mutat.* 30, 221–7. doi:10.1002/humu.20839
- Della Porta, G., Dragani, T.A., Sozzi, G., 1987. Carcinogenic effects of infantile and long-term 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment in the mouse. *Tumori* 73, 99–107.
- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–34. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P., Bonati, L., 2002. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141, 3–24.
- Denison, M.S., Soshilov, A. a, He, G., DeGroot, D.E., Zhao, B., 2011. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* 124, 1–22. doi:10.1093/toxsci/kfr218
- Dennis, E.A., 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269, 13057–60.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51–78. doi:10.1002/mas.20108
- Dey, B.R., Spence, S.L., Nissley, P., Furlanetto, R.W., 1998. Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 24095–101.
- Diliberto, J.J., Burgin, D., Birnbaum, L.S., 1997. Role of CYP1A2 in hepatic sequestration of dioxin: studies using CYP1A2 knock-out mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 431–3. doi:10.1006/bbrc.1997.6973
- Diliberto, J.J., Burgin, D.E., Birnbaum, L.S., 1999. Effects of CYP1A2 on disposition of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in CYP1A2 knockout and parental (C57BL/6N and 129/Sv) strains of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159, 52–64. doi:10.1006/taap.1999.8720
- DiNatale, B.C., Murray, I. a, Schroeder, J.C., Flaveny, C. a, Lahoti, T.S., Laurenzana, E.M., Omiecinski, C.J., Perdew, G.H., 2010. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci.* 115, 89–97. doi:10.1093/toxsci/kfq024
- Dissertation Lohr, C., 2013. Effects of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Polychlorinated Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in Human Liver Cell Models (in vitro) and in Mice (in vivo).
- Dolwick, K.M., Swanson, H.I., Bradfield, C. a, 1993. In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8566–70.
- Doran, E., Whittington, F.M., Wood, J.D., McGivan, J.D., 2004. Characterisation of androstenone metabolism in pig liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.* 147, 141–9. doi:10.1016/j.cbi.2003.12.002
- Drahushuk, a T., McGarrigle, B.P., Tai, H.L., Kitareewan, S., Goldstein, J. a, Olson, J.R., 1996. Validation of precision-cut liver slices in dynamic organ culture as an in vitro model for studying CYP1A1 and CYP1A2 induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 393–403. doi:10.1006/taap.1996.0236
- Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E., 2005. Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289, F8–28. doi:10.1152/ajprenal.00336.2004
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., Golub, T.R., 2008. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–9. doi:10.1038/nature06494
- Ebinuma, H., Saito, H., Saito, Y., Wakabayashi, K., Nakamura, M., Kurose, I., Ishii, H., 1999. Antisense oligodeoxynucleotide against c-myc mRNA induces differentiation of human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 15, 991–9.
- EFSA, 2010. Results of monitoring of dioxins levels in food and feed. *EFSA J.* 8, 1385.

- Eisenbrand, G., Metzler, M., Hennecke, F.J., 2005. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, 3.Auflage ed. Wiley-VCH.
- Ellwood-Yen, K., Graeber, T.G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M.L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G. V, Sawyers, C.L., 2003. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* 4, 223–38.
- Enan, E., Matsumura, F., 1995. Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochem. Pharmacol.* 49, 249–61.
- Endo, T. a, Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, a, Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., Yoshimura, a, 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921–4. doi:10.1038/43213
- Engels, J.W., Lottspeich, F., 2006. *Bioanalytik*, 2.Auflage ed. Spectrum Lehrbücher.
- Erban, J.K., Wagner, D.D., 1992. A 130-kDa protein on endothelial cells binds to amino acids 15-42 of the B beta chain of fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 267, 2451–8.
- Ernst, L. a, Gupta, R.K., Mujumdar, R.B., Waggoner, a S., 1989. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry* 10, 3–10. doi:10.1002/cyto.990100103
- Eskenazi, B., Mocarelli, P., Warner, M., Needham, L., Patterson, D.G., Samuels, S., Turner, W., Gerthoux, P.M., Brambilla, P., 2003. Relationship of Serum TCDD Concentrations and Age at Exposure of Female Residents of Seveso, Italy. *Environ. Health Perspect.* 112, 22–27. doi:10.1289/ehp.6573
- Feldman D, JW, P., FH, G., 2005. *Vitamin D*, XXIX. ed. Elsevier Academic.
- Feng, X.-H., Liang, Y.-Y., Liang, M., Zhai, W., Lin, X., 2002. Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol. Cell* 9, 133–43.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., Amati, B., 2003. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 17, 1115–29. doi:10.1101/gad.1067003
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722–6.
- Fernandez-Salguero, P.M., Gonzalez, F.J., 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 173–9. doi:10.1006/taap.1996.0210
- Fernandez-Salguero, P.M., Ward, J.M., Sundberg, J.P., Gonzalez, F.J., 1997. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet. Pathol.* 34, 605–14. doi:10.1177/030098589703400609
- Fiedler, H., 2003. *The handbook of environmental chemistry*, Volume 3, part O. Persistent organic pollutants - dioxins and furans. Springer Verlag.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155–71.
- Firth, S.M., Baxter, R.C., 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 23, 824–54. doi:10.1210/er.2001-0033
- Flower, R.J., Rothwell, N.J., 1994. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 71–6.
- Forgacs, A.L., Burgoon, L.D., Lynn, S.G., LaPres, J.J., Zacharewski, T., 2010. Effects of TCDD on the expression of nuclear encoded mitochondrial genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 58–65. doi:10.1016/j.taap.2010.04.006
- Friedrich, M., Diesing, D., Cordes, T., Fischer, D., Becker, S., Chen, T.C., Flanagan, J.N., Tangpricha, V., Gherson, I., Holick, M.F., Reichrath, J., 2006. Analysis of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in normal and malignant breast tissue. *Anticancer Res.* 26, 2615–20.

- Friedrichsen, M., Poulsen, P., Wojtaszewski, J., Hansen, P.R., Vaag, A., Rasmussen, H.B., 2013. Carboxylesterase 1 Gene Duplication and mRNA Expression in Adipose Tissue Are Linked to Obesity and Metabolic Function. *PLoS One* 8, e56861. doi:10.1371/journal.pone.0056861
- Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K., 2010. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 86, 40–53. doi:10.2183/pjab.86.40
- Gasiewicz, T.A., Geiger, L.E., Rucci, G., Neal, R.A., n.d. Distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J, DBA/2J, and B6D2F1/J mice. *Drug Metab. Dispos.* 11, 397–403.
- Gaskell, S.J., 1997. Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.* 32, 677–688. doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199707)32:7<677::AID-JMS536>3.0.CO;2-G
- Geckeler, E.K., Eckstein, H., 1998. *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig Wiesbaden.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y.H., Zhang, J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80
- Gibbs, M.A., Thummel, K.E., Shen, D.D., Kunze, K.L., 1999. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of Ki values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab. Dispos.* 27, 180–7.
- Gibbs, S., Fijneman, R., Wiegant, J., van Kessel, A.G., van De Putte, P., Backendorf, C., 1993. Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics* 16, 630–7. doi:10.1006/geno.1993.1240
- Gieling, R.G., Wallace, K., Han, Y.-P., 2009. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1324–31. doi:10.1152/ajpgi.90564.2008
- Gillner, M., Brittebo, E.B., Brandt, I., Söderkvist, P., Appelgren, L.E., Gustafsson, J.A., 1987. Uptake and specific binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the olfactory mucosa of mice and rats. *Cancer Res.* 47, 4150–9.
- Gong, J., Sun, Z., Li, P., 2009. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 121–6. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0bb
- Gonzalez, F.J., Fernandez-Salguero, P., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab. Dispos.* 26, 1194–8.
- Goodwin, B., Redinbo, M.R., Kliewer, S.A., 2002. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 1–23. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.111901.111051
- Gottwald, W., 1992. *RP-HPLC für Anwender*, Vol. 1. Auf. ed. Wiley-VCH.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N., 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 653–99. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.653
- Graw, J., 2007. Nobelpreis 2007 in Medizin : Herstellung von knockout-Mäusen. *Biol. unserer Zeit* 2007, 352–354.
- Greengard, O., Feigelson, P., 1961. The activation and induction of rat liver tryptophan pyrrolase in vivo by its substrate. *J. Biol. Chem.* 236, 158–61.
- Gross, J.H., 2004. *Mass Spectrometry*, 1. Auflage ed. Springer Akademischer Verlag.
- Gumley, T.P., McKenzie, I.F., Sandrin, M.S., 1995. Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. *Immunol. Cell Biol.* 73, 277–96. doi:10.1038/icb.1995.45
- Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., Abel, J., 2009. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 508–20. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.013

- Hahn, M.E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, 23–53.
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 141, 131–60.
- Håkansson, H., Manzoor, E., Ahlborg, U.G., 1991. Interaction between dietary vitamin A and single oral doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the TCDD-induced toxicity and on the vitamin A status in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 37, 239–55.
- Han, W., Pentecost, B.T., Pietropaolo, R.L., Fasco, M.J., Spivack, S.D., 2005. Estrogen receptor alpha increases basal and cigarette smoke extract-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1, but not GSTP1, in normal human bronchial epithelial cells. *Mol. Carcinog.* 44, 202–11. doi:10.1002/mc.20128
- Hanada, K., Nakai, K., Tanaka, H., Suzuki, F., Kumada, H., Ohno, Y., Ozawa, S., Ogata, H., 2011. Effect of nuclear receptor downregulation on hepatic expression of cytochrome P450 and transporters in chronic hepatitis C in association with fibrosis development. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27, 301–306. doi:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-077
- Hankinson, O., 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 307–40. doi:10.1146/annurev.pa.35.040195.001515
- Harrill, J. a, Hukkanen, R.R., Lawson, M., Martin, G., Gilger, B., Soldatow, V., Lecluyse, E.L., Budinsky, R. a, Rowlands, J.C., Thomas, R.S., 2013. Knockout of the aryl hydrocarbon receptor results in distinct hepatic and renal phenotypes in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 503–18. doi:10.1016/j.taap.2013.06.024
- Hatefi, Y., 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015–69. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.005055
- Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Haussler, C. a, Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Selznick, S.H., Dominguez, C.E., Jurutka, P.W., 1998. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* 13, 325–49. doi:10.1359/jbmr.1998.13.3.325
- He, K., Iyer, K.R., Hayes, R.N., Sinz, M.W., Woolf, T.F., Hollenberg, P.F., 1998. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 252–9. doi:10.1021/tx970192k
- Heald, A.H., Kaushal, K., Siddals, K.W., Rudenski, A.S., Anderson, S.G., Gibson, J.M., 2006. Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) is a marker for the metabolic syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 114, 371–6. doi:10.1055/s-2006-924320
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., Schaper, F., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20. doi:10.1042/BJ20030407
- Henck, J.M., New, M.A., Kociba, R.J., Rao, K.S., 1981. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: acute oral toxicity in hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 405–7.
- Hines, R.N., Cashman, J.R., Philpot, R.M., Williams, D.E., Ziegler, D.M., 1994. The mammalian flavin-containing monooxygenases: molecular characterization and regulation of expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125, 1–6. doi:10.1006/taap.1994.1042
- Höbaus, J., Hummel, D.M., Thiem, U., Fetahu, I.S., Aggarwal, A., Müllauer, L., Heller, G., Egger, G., Mesteri, I., Baumgartner-Parzer, S., Kallay, E., 2013. Increased copy-number and not DNA hypomethylation causes overexpression of the candidate proto-oncogene CYP24A1 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 133, 1380–8. doi:10.1002/ijc.28143
- Hoenerhoff, M.J., Pandiri, A.R., Lahousse, S. a, Hong, H.-H., Ton, T.-V., Masinde, T., Auerbach, S.S., Gerrish, K., Bushel, P.R., Shockley, K.R., Peddada, S.D., Sills, R.C., 2011. Global gene profiling of spontaneous hepatocellular carcinoma in B6C3F1 mice: similarities in the molecular landscape with human liver cancer. *Toxicol. Pathol.* 39, 678–99. doi:10.1177/0192623311407213
- Hollywood, K., Brison, D.R., Goodacre, R., 2006. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 6, 4716–23. doi:10.1002/pmic.200600106

- Holsapple, M.P., Morris, D.L., Wood, S.C., Snyder, N.K., 1991. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: possible mechanisms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 73–100. doi:10.1146/annurev.pa.31.040191.000445
- Honkakoski, P., Moore, R., Gynther, J., Negishi, M., 1996. Characterization of phenobarbital-inducible mouse Cyp2b10 gene transcription in primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 9746–53. doi:10.1074/jbc.271.16.9746
- Honkakoski, P., Negishi, M., 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* 347, 321–37.
- Huntington, J. a., 2006. Shape-shifting serpins – advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 31, 427–435. doi:10.1016/j.tibs.2006.06.005
- IARC, 1997. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Int. Agency Res. Cancer* 69:1–631.
- Ishida, M., Choi, J., Hirabayashi, K., Matsuwaki, T., Suzuki, M., Yamanouchi, K., Horai, R., Sudo, K., Iwakura, Y., Nishihara, M., 2007. Reproductive phenotypes in mice with targeted disruption of the 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *J. Reprod. Dev.* 53, 499–508.
- Ishimura, Y., Nozaki, M., Hayaishi, O., 1970. The oxygenated form of L-tryptophan 2,3-dioxygenase as reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* 245, 3593–602.
- Issa, L.L., Leong, G.M., Eisman, J.A., 1998. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm. Res.* 47, 451–75.
- Issaq, H.J., Van, Q.N., Waybright, T.J., Muschik, G.M., Veenstra, T.D., 2009. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J. Sep. Sci.* 32, 2183–99. doi:10.1002/jssc.200900152
- Jez, J.M., Flynn, T.G., Penning, T.M., 1997. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 54, 639–47.
- Jin, B., Kim, G., Park, D.W., Ryu, D.-Y., 2004. Microarray analysis of gene regulation in the Hepa1c1c7 cell line following exposure to the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. In Vitro* 18, 659–64. doi:10.1016/j.tiv.2004.02.006
- Johnson, C.S., Muindi, J.R., Hersherberger, P. a, Trump, D.L., 2006. The antitumor efficacy of calcitriol: preclinical studies. *Anticancer Res.* 26, 2543–9.
- Jones, J.I., Clemmons, D.R., 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3–34. doi:10.1210/edrv-16-1-3
- Jones, K.C., de Voogt, P., 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ. Pollut.* 100, 209–21.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.-C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrançois-Martinez, A.-M., Martinez, A., Urade, Y., 2009. Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J. Biochem.* 145, 161–8. doi:10.1093/jb/mvn152
- Kanai, M., Funakoshi, H., Takahashi, H., Hayakawa, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., 2009. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol. Brain* 2, 8. doi:10.1186/1756-6606-2-8
- Kang, M.J., Lee, D., Joo, W., Kim, C., 2005. Plasma protein level changes in waste incineration workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Proteome Res.* 4, 1248–55. doi:10.1021/pr049756d
- Kang, Y.H., Ji, N.Y., Lee, C. Il, Lee, H.G., Kim, J.W., Yeom, Y. Il, Kim, D.G., Yoon, S.K., Kim, J.W., Park, P.J., Song, E.Y., 2011. ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. *Amino Acids* 40, 1003–13. doi:10.1007/s00726-010-0729-6
- Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y., 2007. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 464, 207–12. doi:10.1016/j.abb.2007.03.038

- Kawamoto, T., Mitsuchi, Y., Toda, K., Yokoyama, Y., Miyahara, K., Miura, S., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Nakao, K., Imura, H., 1992. Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1458–62.
- Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K., Negishi, M., 1999. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6318–22.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., Leder, P., 1983. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603–10.
- Kennedy, S.W., Jones, S.P., 1994. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Anal. Biochem.* doi:10.1006/abio.1994.1476
- Kim, H.-J., Jeong, K.-S., Park, S.-J., Cho, S.-W., Son, H.-Y., Kim, S.-R., Kim, S.-H., An, M.-Y., Ryu, S.-Y., 2003. Effects of benzo[alpha]pyrene, 2-bromopropane, phenol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on IL-6 production in mice after single or repeated exposure. *In Vivo* 17, 269–75.
- Kim, S., Li, Q., Dang, C. V, Lee, L. a, 2000. Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11198–202. doi:10.1073/pnas.200372597
- Kinehara, M., Fukuda, I., Yoshida, K., Ashida, H., 2009. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the cytosolic phospholipase A(2)alpha gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 277–81. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.04.015
- Kinehara, M., Fukuda, I., Yoshida, K.-I., Ashida, H., 2008. High-throughput evaluation of aryl hydrocarbon receptor-binding sites selected via chromatin immunoprecipitation-based screening in Hepa-1c1c7 cells stimulated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Genes Genet. Syst.* 83, 455–68.
- Kliwer, S.A., 2003. The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *J. Nutr.* 133, 2444S–2447S.
- Klopot, A., Hance, K.W., Peleg, S., Barsony, J., Fleet, J.C., 2007. Nucleo-cytoplasmic cycling of the vitamin D receptor in the enterocyte-like cell line, Caco-2. *J. Cell. Biochem.* 100, 617–28. doi:10.1002/jcb.21087
- Knerr, S., Schrenk, D., 2006. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 897–907. doi:10.1002/mnfr.200600006
- Kociba, R.J., Keeler, P.A., Park, C.N., Gehring, P.J., 1976. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): results of a 13-week oral toxicity study in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35, 553–74.
- Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Carreon, R.M., Wade, C.E., Dittenber, D.A., Kalnins, R.P., Frauson, L.E., Park, C.N., Barnard, S.D., Hummel, R.A., Humiston, C.G., 1978. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46, 279–303.
- Kong, K.L., Kwong, D.L., Fu, L., Chan, T.H.M., Chen, L., Liu, H., Li, Y., Zhu, Y.-H., Bi, J., Qin, Y.-R., Law, S.Y.K., Guan, X.-Y., 2010. Characterization of a candidate tumor suppressor gene uroplakin 1A in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 70, 8832–41. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0779
- Kopec, A.K., Burgoon, L.D., Ibrahim-Aibo, D., Mets, B.D., Tashiro, C., Potter, D., Sharratt, B., Harkema, J.R., Zacharewski, T.R., 2010. PCB153-elicited hepatic responses in the immature, ovariectomized C57BL/6 mice: comparative toxicogenomic effects of dioxin and non-dioxin-like ligands. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 359–71. doi:10.1016/j.taap.2009.12.003
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., Lowell, B.B., 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 248–261. doi:10.1038/nrm1592
- Kumar, R., Moharir, M., Yau, I., Williams, S., 2013. A novel mutation in the SerpinC1 gene presenting as unprovoked neonatal cerebral sinus venous thrombosis in a kindred. *Pediatr. Blood Cancer* 60, 133–136. doi:10.1002/pbc.24302
- Lahvis, G.P., Lindell, S.L., Thomas, R.S., McCuskey, R.S., Murphy, C., Glover, E., Bentz, M., Southard, J., Bradfield, C. a, 2000. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10442–7. doi:10.1073/pnas.190256997

- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L., 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759–64.
- Lassalle, P., Molet, S., Janin, a, Heyden, J. V, Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R., Tonnel, a B., 1996. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J. Biol. Chem.* 271, 20458–64.
- Lau, L.F., Nathans, D., 1987. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 1182–6.
- Lechner, D., Kállay, E., Cross, H.S., 2007. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 263, 55–64. doi:10.1016/j.mce.2006.08.009
- Ledirac, N., Delescluse, C., de Sousa, G., Pralavorio, M., Lesca, P., Amichot, M., Bergé, J.B., Rahmani, R., 1997. Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 177–82. doi:10.1006/taap.1997.8120
- Lee, A., 2012. The role of CREB-H transcription factor in triglyceride metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 23, 141–6. doi:10.1097/MOL.0b013e3283508fed
- Lee, I.J., Jeong, K.S., Roberts, B.J., Kallararak, A.T., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F.J., Song, B.J., 1996. Transcriptional induction of the cytochrome P4501A1 gene by a thiazolium compound, YH439. *Mol. Pharmacol.* 49, 980–8.
- Lee, J.H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M.J., Gonzalez, F.J., Xie, W., 2010. A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 139, 653–63. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.033
- Lelbach, A., Scharf, J.G., Ramadori, G., 2001. Regulation of insulin-like growth factor-I and of insulin-like growth factor binding protein-1, -3 and -4 in cocultures of rat hepatocytes and Kupffer cells by interleukin-6. *J. Hepatol.* 35, 558–67.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S., Nevins, J.R., 1998. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev.* 12, 2120–2130. doi:10.1101/gad.12.14.2120
- Levens, D., 2010. You Don't Muck with MYC. *Genes Cancer* 1, 547–554. doi:10.1177/1947601910377492
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–19. doi:10.1016/j.cell.2007.01.015
- Li, X., Johnson, D.C., Rozman, K.K., 1995. Reproductive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female rats: ovulation, hormonal regulation, and possible mechanism(s). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 321–7.
- Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W.K., Zhang, M.Q., Ren, B., 2003. A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8164–9. doi:10.1073/pnas.1332764100
- Lin, S., Yang, Z., Zhang, X., Bian, Z., Cai, Z., 2011. Hippocampal metabolomics reveals 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity associated with ageing in Sprague-Dawley rats. *Talanta* 85, 1007–12. doi:10.1016/j.talanta.2011.05.007
- Lin, T.M., Ko, K., Moore, R.W., Buchanan, D.L., Cooke, P.S., Peterson, R.E., 2001. Role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed male mice. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 64, 327–42. doi:10.1080/152873901316981312
- Linz, U., Degenhardt, H., 1990. Polymerase chain reaction: an overview. *Naturwissenschaften* 77, 515–30.
- Liu, J., Levens, D., 2006. Making Myc, in: Eisenman, P.D.R.N. (Ed.), *The Myc/Max/Mad Transcription Factor Network*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–32.
- Lohmann, R., Jones, K.C., 1998. Dioxins and furans in air and deposition: a review of levels, behaviour and processes. *Sci. Total Environ.* 219, 53–81.
- Louro, I.D., Bailey, E.C., Li, X., South, L.S., McKie-Bell, P.R., Yoder, B.K., Huang, C.C., Johnson, M.R., Hill, A.E., Johnson, R.L., Ruppert, J.M., 2002. Comparative gene expression profile analysis of GLI and c-MYC in an epithelial model of malignant transformation. *Cancer Res.* 62, 5867–73.

- Lovenberg, W., Weissbach, H., Udenfriend, S., 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 237, 89–93.
- Lüscher, B., Larsson, L.G., 1999. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* 18, 2955–66. doi:10.1038/sj.onc.1202750
- Lüscher, B., Vervoorts, J., 2012. Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. *Gene* 494, 145–60. doi:10.1016/j.gene.2011.12.027
- Lussier, M.P., Lepage, P.K., Bousquet, S.M., Boulay, G., 2008. RNF24, a new TRPC interacting protein, causes the intracellular retention of TRPC. *Cell Calcium* 43, 432–43. doi:10.1016/j.ceca.2007.07.009
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.-C., Lee, S.C., 2006. Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals: Halogenated Hydrocarbons: Volume 2. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Mai, S., Mårtensson, I.L., 1995. The c-myc protein represses the lambda 5 and TdT initiators. *Nucleic Acids Res.* 23, 1–9.
- Marquardt, H., Schäfer, S.G., 2004. Lehrbuch der Toxikologie, 2.Auflage ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Martignoni, M., Groothuis, G.M.M., de Kanter, R., 2006. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 875–94. doi:10.1517/17425255.2.6.875
- Masaki, T., Tokuda, M., Ohnishi, M., Watanabe, S., Fujimura, T., Miyamoto, K., Itano, T., Matsui, H., Arima, K., Shirai, M., Maeba, T., Sogawa, K., Konishi, R., Taniguchi, K., Hatanaka, Y., Hatase, O., Nishioka, M., 1996. Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24, 72–81. doi:10.1053/jhep.1996.v24.pm0008707286
- Masuyama, H., MacDonald, P.N., 1998. Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J. Cell. Biochem.* 71, 429–40.
- Matissek, R., Steiner, G., Fischer, M., 2009. Lebensmittelanalytik, 4.Auflage ed. Springer Akademischer Verlag.
- Matsunawa, M., Akagi, D., Uno, S., Endo-Umeda, K., Yamada, S., Ikeda, K., Makishima, M., 2012. Vitamin D receptor activation enhances benzo[a]pyrene metabolism via CYP1A1 expression in macrophages. *Drug Metab. Dispos.* 40, 2059–66. doi:10.1124/dmd.112.046839
- Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., Makishima, M., 2009. The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages. *Toxicol. Sci.* 109, 50–8. doi:10.1093/toxsci/kfp044
- Matthews, J., Gustafsson, J.-A., 2006. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 4, e016. doi:10.1621/nrs.04016
- Mazure, N.M., Chauvet, C., Bois-Joyeux, B., Bernard, M., Nacer-Chérif, H., Danan, J.-L., 2002. Repression of alpha-fetoprotein gene expression under hypoxic conditions in human hepatoma cells: characterization of a negative hypoxia response element that mediates opposite effects of hypoxia inducible factor-1 and c-Myc. *Cancer Res.* 62, 1158–65.
- Mazza, R., Imbrogno, S., Tota, B., 2010. The interplay between chromogranin A-derived peptides and cardiac natriuretic peptides in cardioprotection against catecholamine-evoked stress. *Regul. Pept.* 165, 86–94. doi:10.1016/j.regpep.2010.05.005
- McConnell, E.E., Moore, J.A., Haseman, J.K., Harris, M.W., 1978. The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44, 335–56.
- Mead, J.R., Irvine, S. a, Ramji, D.P., 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med. (Berl)*. 80, 753–69. doi:10.1007/s00109-002-0384-9
- Menssen, A., Hermeking, H., 2002. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6274–9. doi:10.1073/pnas.082005599
- Meyer, N., Penn, L.Z., 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* 8, 976–90. doi:10.1038/nrc2231

- Meyer, V.R., 2002. Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, 8.Auflage ed. Otto Salle Verlag.
- Miettinen, S., Ahonen, M.H., Lou, Y.-R., Manninen, T., Tuohimaa, P., Syväälä, H., Ylikomi, T., 2004. Role of 24-hydroxylase in vitamin D3 growth response of OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* 108, 367–73. doi:10.1002/ijc.11520
- Milbrath, M.O., Wenger, Y., Chang, C.-W., Emond, C., Garabrant, D., Gillespie, B.W., Jolliet, O., 2009. Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. *Environ. Health Perspect.* 117, 417–25. doi:10.1289/ehp.11781
- Mimori, K., 2004. Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann. Oncol.* 15, 236–241. doi:10.1093/annonc/mdh056
- Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 263–8.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y., 1997. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645–54.
- Minami, K., Nakajima, M., Fujiki, Y., Katoh, M., Gonzalez, F.J., Yokoi, T., 2008. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and lipoprotein lipase by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Toxicol. Sci.* 33, 405–13.
- Mitsuhashi, N., Kobayashi, S., Doki, T., Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., Kato, A., Yoshitomi, H., Nozawa, S., Furukawa, K., Takeuchi, D., Suda, K., Miura, S., Miyazaki, M., 2008. Clinical significance of alpha-fetoprotein: involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, e189–97. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05340.x
- Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y., Sugiyama, Y., 2003. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.* 55, 425–61. doi:10.1124/pr.55.3.1
- Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Patterson, D.G., Milani, S., Limonta, G., Bertona, M., Signorini, S., Tramacere, P., Colombo, L., Crespi, C., Brambilla, P., Sarto, C., Carreri, V., Sampson, E.J., Turner, W.E., Needham, L.L., 2008. Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ. Health Perspect.* 116, 70–7. doi:10.1289/ehp.10399
- Moffat, I.D., Boutros, P.C., Chen, H., Okey, A.B., Pohjanvirta, R., 2010. Aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated transcriptomic changes in rats sensitive or resistant to major dioxin toxicities. *BMC Genomics* 11, 263. doi:10.1186/1471-2164-11-263
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11–24.
- Monostory, K., Pascucci, J., 2008. Regulation of Drug-metabolizing Human Cytochrome P450s. *Acta Chim. Slov.* 20–37.
- Moore, L.B., Parks, D.J., Jones, S. a, Bledsoe, R.K., Consler, T.G., Stimmel, J.B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S.G., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliewer, S. a, 2000. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* 275, 15122–7. doi:10.1074/jbc.M001215200
- Moss, S.E., 1995. Ion channels. Annexins taken to task. *Nature* 378, 446–7. doi:10.1038/378446a0
- Müller, H.-J., Röder, T., 2004. Der Experimentator Microarrays, 1.Auflage ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–50.
- Murphy, K.A., Quadro, L., White, L.A., 2007. The intersection between the aryl hydrocarbon receptor (AhR)- and retinoic acid-signaling pathways. *Vitam. Horm.* 75, 33–67. doi:10.1016/S0083-6729(06)75002-6
- Murray, G.I., Barnes, T.S., Sewell, H.F., Ewen, S.W., Melvin, W.T., Burke, M.D., 1988. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 25, 465–75.

- Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D., 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777–83.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M., 2008. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Nakai, K., Tanaka, H., Hanada, K., Ogata, H., Suzuki, F., Kumada, H., Miyajima, A., Ishida, S., Sunouchi, M., Habano, W., Kamikawa, Y., Kubota, K., Kita, J., Ozawa, S., Ohno, Y., 2008. Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chron. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1786–93. doi:10.1124/dmd.107.020073
- Nakamura, T., Niimi, S., Nawa, K., Noda, C., Ichihara, a, Takagi, Y., Anai, M., Sakaki, Y., 1987. Multihormonal regulation of transcription of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene in primary cultures of adult rat hepatocytes with special reference to the presence of a transcriptional protein mediating the action of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 262, 727–33.
- Narayanan, R.P., Fu, B., Heald, A.H., Siddals, K.W., Oliver, R.L., Hudson, J.E., Payton, A., Anderson, S.G., White, A., Ollier, W.E.R., Gibson, J.M., 2012. IGFBP2 is a biomarker for predicting longitudinal deterioration in renal function in type 2 diabetes. *Endocr. Connect.* 1, 95–102. doi:10.1530/EC-12-0053
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–50. doi:10.1074/jbc.R400004200
- Nebert, D.W., Roe, a L., Dieter, M.Z., Solis, W. a, Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65–85.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1–42.
- Nesbit, C.E., Tersak, J.M., Prochownik, E. V, 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004–16. doi:10.1038/sj.onc.1202746
- Nevezorova, Y. a, Hu, W., Cubero, F.J., Haas, U., Freimuth, J., Tacke, F., Trautwein, C., Liedtke, C., 2013. Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1765–75. doi:10.1016/j.bbdis.2013.06.001
- Nguyen, L.P., Bradfield, C. a, 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 102–16. doi:10.1021/tx7001965
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S., Heaton, G.M., 1978. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Suppl.* 32, 89–93.
- Niittynen, M., Tuomisto, J.T., Auriola, S., Pohjanvirta, R., Syrjälä, P., Simanainen, U., Viluksela, M., Tuomisto, J., 2003. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced accumulation of biliverdin and hepatic peliosis in rats. *Toxicol. Sci.* 71, 112–23.
- Nilsson, C.B., Håkansson, H., 2002. The retinoid signaling system--a target in dioxin toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 32, 211–32. doi:10.1080/20024091064228
- Noyola-Martinez, N., Díaz, L., Zaga-Clavellina, V., Avila, E., Halhali, A., Larrea, F., Barrera, D., 2013. Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 gene expression by recombinant pro-inflammatory cytokines in cultured human trophoblasts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 25–28. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.12.007
- NTP, 1982. Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-dibenzo-p-dioxin in Swiss Webster mice (dermal study). In NTP Tech. Rept. Ser. 201, DHEW publication No. (NIH) 82-1757, NIH Research Triangle Park, NC., NTP Tech. Rept. Ser.
- Nuutinen, S., Panula, P., 2011. Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 709, 95–107. doi:10.1007/978-1-4419-8056-4_10

- O'Bryan, M.K., Foulds, L.M., Cannon, J.F., Winnall, W.R., Muir, J. a, Sebire, K., Smith, a I., Keah, H.-H., Hearn, M.T.W., de Kretser, D.M., Hedger, M.P., 2004. Identification of a novel apolipoprotein, ApoN, in ovarian follicular fluid. *Endocrinology* 145, 5231–42. doi:10.1210/en.2004-0630
- O'Connell, B.C., Cheung, A.F., Simkevich, C.P., Tam, W., Ren, X., Mateyak, M.K., Sedivy, J.M., 2003. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J. Biol. Chem.* 278, 12563–73. doi:10.1074/jbc.M210462200
- O'Kane, A.A., Chevallier, O.P., Graham, S.F., Elliott, C.T., Mooney, M.H., 2013. Metabolomic profiling of in vivo plasma responses to dioxin-associated dietary contaminant exposure in rats: implications for identification of sources of animal and human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5409–18. doi:10.1021/es305345u
- Oberg, M., Bergander, L., Håkansson, H., Rannug, U., Rannug, A., 2005. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol. Sci.* 85, 935–43. doi:10.1093/toxsci/kfi154
- Omori, Y., Imai, J., Watanabe, M., Komatsu, T., Suzuki, Y., Kataoka, K., Watanabe, S., Tanigami, a, Sugano, S., 2001. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res.* 29, 2154–62.
- Opitz, C. a., Litzenburger, U.M., Sahn, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G.J., Miller, C.L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W., Platten, M., 2011. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203. doi:10.1038/nature10491
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. a, Dang, C. V., 2000. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–800. doi:10.1074/jbc.C000023200
- Pajares, M. a, Pérez-Sala, D., 2006. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2792–803. doi:10.1007/s00018-006-6249-6
- Park, J.Y., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., 1996. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2322–7.
- Parker, K.L., Schimmer, B.P., Chaplin, D.D., Seidman, J.G., 1986. Characterization of a regulatory region of the steroid 21-hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* 261, 15353–5.
- Patel, J.H., Loboda, A.P., Showe, M.K., Showe, L.C., McMahon, S.B., 2004. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat. Rev. Cancer* 4, 562–8. doi:10.1038/nrc1393
- Pazdernik, T.L., Rozman, K.K., 1985. Effect of thyroidectomy and thyroxine on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced immunotoxicity. *Life Sci.* 36, 695–703.
- Pečina-Slaus, N., 2003. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.* 3, 17. doi:10.1186/1475-2867-3-17
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* 88, 1379–406. doi:10.1152/physrev.90100.2007
- Pelletier, G., Luu-The, V., Ren, S.L., L., Labrie, F., 2003. Sex-related Expression of 20 -hydroxysteroid Dehydrogenase mRNA in the Adult Mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1425–1436. doi:10.1177/002215540305101103
- Perutz, M.F., 1960. Structure of hemoglobin. *Brookhaven Symp. Biol.* 13, 165–83.
- Pestka, S., Krause, C.D., Sarkar, D., Walter, M.R., Shi, Y., Fisher, P.B., 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 929–79. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622
- Peterson, R.E., Theobald, H.M., Kimmel, G.L., 1993. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 283–335. doi:10.3109/10408449309105013

- Peterson, T., Hodgson, P., Fernandez-Salguero, P., Neumeister, M., Gonzalez, F., 2000. Hepatic fibrosis and cytochrome P450: experimental models of fibrosis compared to AHR knockout mice. *Hepatol. Res.* 17, 112–125.
- Petrick, J.S., Klaassen, C.D., 2007. Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1806–15. doi:10.1124/dmd.107.015974
- Pierre, S., Chevallier, A., Teixeira-Clerc, F., Ambolet-Camoit, A., Bui, L.-C., Bats, A.-S., Fournet, J.-C., Fernandez-Salguero, P., Aggerbeck, M., Lotersztajn, S., Barouki, R., Coumoul, X., 2014. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *Toxicol. Sci.* 137, 114–24. doi:10.1093/toxsci/kft236
- Piper, W.N., Rose, J.Q., Gehring, P.J., 1973. Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Environ. Health Perspect.* 5, 241–4.
- Pirkle, J.L., Wolfe, W.H., Patterson, D.G., Needham, L.L., Michalek, J.E., Miner, J.C., Peterson, M.R., Phillips, D.L., 1989. Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam Veterans of Operation Ranch Hand. *J. Toxicol. Environ. Health* 27, 165–71. doi:10.1080/15287398909531288
- Pohjanen, E., Thysell, E., Jonsson, P., Eklund, C., Silfver, A., Carlsson, I., Lundgren, K., Moritz, T., Svensson, M.B., Antti, H., 2007. A multivariate screening strategy for investigating metabolic effects of strenuous physical exercise in human serum. *J. Proteome Res.* 6, 2113–20. doi:10.1021/pr070007g
- Pohjanvirta, R., Miettinen, H., Sankari, S., Hegde, N., Lindén, J., 2012. Unexpected gender difference in sensitivity to the acute toxicity of dioxin in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 167–76. doi:10.1016/j.taap.2012.04.032
- Pohjanvirta, R., Vartiainen, T., Uusi-Rauva, A., Mönkkönen, J., Tuomisto, J., 1990. Tissue distribution, metabolism, and excretion of 14C-TCDD in a TCDD-susceptible and a TCDD-resistant rat strain. *Pharmacol. Toxicol.* 66, 93–100.
- Poiger, H., Buser, H.R., Weber, H., Zweifel, U., Schlatter, C., 1982. Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites. *Experientia* 38, 484–6.
- Poiger, H., Schlatter, C., 1979. Biological degradation of TCDD in rats. *Nature* 281, 706–7.
- Poland, A., Glover, E., Kende, A.S., 1976. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 251, 4936–46.
- Poland, A., Knutson, J.C., 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517–54. doi:10.1146/annurev.pa.22.040182.002505
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J.Z., Wu, J., Zhou, H.-M., Li, P., 2008. Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J.* 27, 1537–48. doi:10.1038/emboj.2008.92
- Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., 1993. Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: transcriptional activation of the human CYP1A1 gene. *Mol. Pharmacol.* 43, 504–8.
- Quattrochi, L.C., Vu, T., Tukey, R.H., 1994. The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction. *J. Biol. Chem.* 269, 6949–54.
- Rachez, C., Freedman, L.P., 2000. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* 246, 9–21.
- Ramadori, G., Armbrust, T., 2001. Cytokines in the liver. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 777–84.
- Ramsey, J.C., Hefner, J.G., Karbowski, R.J., Braun, W.H., Gehring, P.J., 1982. The in vivo biotransformation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65, 180–4.
- Rannug, a, Rannug, U., Rosenkranz, H.S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E., Grafström, a K., 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262, 15422–7.

- Rannug, U., Rannug, a, Sjöberg, U., Li, H., Westerholm, R., Bergman, J., 1995. Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem. Biol.* 2, 841–5.
- Recalcati, S., 2003. Oxidative stress-mediated down-regulation of rat hydroxyacid oxidase 1, a liver-specific peroxisomal enzyme. *Hepatology* 38, 1159–1166. doi:10.1053/jhep.2003.50417
- Reisz-Porszasz, S., Reyes, H., DeLuca, H.F., Prahl, J.M., Hankinson, O., 1993. Investigation on the potential role of the Ah receptor nuclear translocator protein in vitamin D receptor action. *J. Recept. Res.* 13, 1147–59.
- Reiter, V., Matschkal, D.M.S., Wagner, M., Globisch, D., Kneuttinger, A.C., Müller, M., Carell, T., 2012. The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA. *Nucleic Acids Res.* 40, 6235–40. doi:10.1093/nar/gks240
- Renaud, H.J., Cui, J.Y., Khan, M., Klaassen, C.D., 2011. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol. Sci.* 124, 261–77. doi:10.1093/toxsci/kfr240
- Renwick, A.B., Mistry, H., Barton, P.T., Mallet, F., Price, R.J., Beaman, J.A., Lake, B.G., 1999. Effect of some indole derivatives on xenobiotic metabolism and xenobiotic-induced toxicity in cultured rat liver slices. *Food Chem. Toxicol.* 37, 609–18.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O., 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193–5.
- Richards, N.G.J., Kilberg, M.S., 2006. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 629–54. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142520
- Ridley, S.H., Ktistakis, N., Davidson, K., Anderson, K.E., Manifava, M., Ellson, C.D., Lipp, P., Bootman, M., Coadwell, J., Nazarian, a, Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cooper, M. a, Thuring, J.W., Lim, Z.Y., Holmes, a B., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., 2001. FENS-1 and DFCP1 are FYVE domain-containing proteins with distinct functions in the endosomal and Golgi compartments. *J. Cell Sci.* 114, 3991–4000.
- Rochfort, S., 2005. Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J. Nat. Prod.* 68, 1813–20. doi:10.1021/np050255w
- Rohan, J.N.P., Weigel, N.L., 2009. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology* 150, 2046–54. doi:10.1210/en.2008-1395
- Rone, M.B., Fan, J., Papadopoulos, V., 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 646–58. doi:10.1016/j.bbali.2009.03.001
- Rose, J.Q., Ramsey, J.C., Wentzler, T.H., Hummel, R.A., Gehring, P.J., 1976. The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin following single and repeated oral doses to the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36, 209–26.
- Rowlands, J.C., Gustafsson, J.A., 1997. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 27, 109–34. doi:10.3109/10408449709021615
- Rubin, R.T., 1967. Adrenal cortical activity changes in manic-depressive illness. Influence on intermediary metabolism of tryptophan. *Arch. Gen. Psychiatry* 17, 671–9.
- Ruttloff, H., 1979. P. Karlson: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 10. Auflage, 418 Seiten, 90 Abb., 23 Tab., 287 Formelbilder und Schemata, 1 Faltafel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977. Preis: 36,- DM. *Food / Nahrung* 23, 193–194. doi:10.1002/food.19790230232
- Safe, S., 2001. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 120, 1–7.
- Safe, S., Krishnan, V., 1995. Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch. Toxicol. Suppl.* 17, 99–115.
- Sakaki, T., Kagawa, N., Yamamoto, K., Inouye, K., 2005. Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front. Biosci.* 10, 119–34.

- Sakuma, T., Endo, Y., Mashino, M., Kuroiwa, M., Ohara, A., Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 2002. Regulation of the expression of two female-predominant CYP3A mRNAs (CYP3A41 and CYP3A44) in mouse liver by sex and growth hormones. *Arch. Biochem. Biophys.* 404, 234–42.
- Salehi-Tabar, R., Nguyen-Yamamoto, L., Tavera-Mendoza, L.E., Quail, T., Dimitrov, V., An, B.-S., Glass, L., Goltzman, D., White, J.H., 2012. Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18827–32. doi:10.1073/pnas.1210037109
- Salomon, H.-V., Geyer, H., Gille, U., 2005. *Anatomie für die Tiermedizin*, 1.Auflage ed. Enke Verlag, Thieme.
- Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P., Delehedde, M., 2006. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1765, 25–37. doi:10.1016/j.bbcan.2005.08.004
- SCF, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risk Assessment of Dioxins and Dioxin-like PCBs in Food.
- Schechter, A., Gasiewicz, T.A., 1987. Health hazard assessment of chlorinated dioxins and dibenzofurans contained in human milk. *Chemosphere* 16, 2147–2154. doi:10.1016/0045-6535(87)90223-2
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–70.
- Schimke, R.T., Sweeney, E.W., Berlin, C.M., 1965. The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver Tryptophan Pyrrrolase. *J. Biol. Chem.* 240, 322–31.
- Schmidt, J. V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., Bradfield, C. a, 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6731–6.
- Schoenenberger, C.A., Andres, A.C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., Gerlinger, P., 1988. Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J.* 7, 169–75.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Hölzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, a, Weidle, U.H., Eick, D., 2001. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* 29, 397–406.
- Schwetz, B.A., Norris, J.M., Sparschu, G.L., Rowe, U.K., Gehring, P.J., Emerson, J.L., Gerbig, C.G., 1973. Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ. Health Perspect.* 5, 87–99.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., Nevins, J.R., 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14, 2501–14. doi:10.1101/gad.836800.in
- Seefeld, M.D., Corbett, S.W., Keesey, R.E., Peterson, R.E., 1984. Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 311–22.
- Seidel, S.D., Winters, G.M., Rogers, W.J., Ziccardi, M.H., Li, V., Keser, B., Denison, M.S., 2001. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 187–96.
- Sewall, C.H., Flagler, N., Vanden Heuvel, J.P., Clark, G.C., Tritscher, A.M., Maronpot, R.M., Lucier, G.W., 1995. Alterations in thyroid function in female Sprague-Dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 237–44.
- Sheiness, D., Bishop, J.M., 1979. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J. Virol.* 31, 514–21.
- Shen, E.S., Gutman, S.I., Olson, J.R., 1991. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated hepatotoxicity in C57BL/6J and DBA/2J mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 32, 367–81. doi:10.1080/15287399109531491
- Shimada, T., Inoue, K., Suzuki, Y., Kawai, T., Azuma, E., Nakajima, T., Shindo, M., Kurose, K., Sugie, A., Yamagishi, Y., Fujii-Kuriyama, Y., Hashimoto, M., 2002. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 23, 1199–207.

- Skoog, D.A., Leary, J.J., 1996. *Instrumentelle Analytik - Grundlagen, geräte und Anwendungen*, 4. Auflage. ed. Springer Akademischer Verlag.
- Smith, A.G., Clothier, B., Robinson, S., Scullion, M.J., Carthew, P., Edwards, R., Luo, J., Lim, C.K., Toledano, M., 1998. Interaction between iron metabolism and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice with variants of the Ahr gene: a hepatic oxidative mechanism. *Mol. Pharmacol.* 53, 52–61.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3, Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027
- Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., 1997. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J. Biochem.* 122, 1075–9.
- Sorg, O., Zennegg, M., Schmid, P., Fedosyuk, R., Valikhnovskiy, R., Gaide, O., Kniazevych, V., Saurat, J.-H., 2009. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites. *Lancet* 374, 1179–85. doi:10.1016/S0140-6736(09)60912-0
- Sotnichenko, A.I., Severin, S.E., Posypanova, G.A., Feldman, N.B., Grigor'ev, M.I., Severin, E.S., Petrov, R. V., 1999. Water-soluble 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin complex with human alpha-fetoprotein: properties, toxicity in vivo and antitumor activity in vitro. *FEBS Lett.* 450, 49–51.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, a, Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massagué, J., Hänel, F., Eilers, M., 2001. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat. Cell Biol.* 3, 392–9. doi:10.1038/35070076
- Stenmark, H., Olkkonen, V.M., 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3007.
- Straus, D.S., 2013. TNF α and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer* 12, 78. doi:10.1186/1476-4598-12-78
- Sunden, S.L., Renduchintala, M.S., Park, E.I., Miklasz, S.D., Garrow, T. a, 1997. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 345, 171–4. doi:10.1006/abbi.1997.0246
- Swales, K., Negishi, M., 2004. CAR, driving into the future. *Mol. Endocrinol.* 18, 1589–98. doi:10.1210/me.2003-0397
- Takahashi, N., Dashwood, R.H., Bjeldanes, L.F., Bailey, G.S., Williams, D.E., 1995. Regulation of hepatic cytochrome P4501A by indole-3-carbinol: transient induction with continuous feeding in rainbow trout. *Food Chem. Toxicol.* 33, 111–20.
- Tan, Z., Chang, X., Puga, A., Xia, Y., 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem. Pharmacol.* 64, 771–80.
- Tang, T., François, N., Glatigny, A., Agier, N., Mucchielli, M.-H., Aggerbeck, L., Delacroix, H., 2007. Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics* 23, 2686–91. doi:10.1093/bioinformatics/btm399
- Taupenot, L., Harper, K.L., O'Connor, D.T., 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N. Engl. J. Med.* 348, 1134–49. doi:10.1056/NEJMra021405
- Thorgeirsson, S.S., Grisham, J.W., 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 31, 339–46. doi:10.1038/ng0802-339
- Thunberg, T., Ahlborg, U.G., Johnsson, H., 1979. Vitamin A (retinol) status in the rat after a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Toxicol.* 42, 265–74.
- Tijet, N., Boutros, P.C., Moffat, I.D., Okey, A.B., Tuomisto, J., Pohjanvirta, R., 2006. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol. Pharmacol.* 69, 140–53. doi:10.1124/mol.105.018705

- Timsit, Y.E., Negishi, M., 2007. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72, 231–46. doi:10.1016/j.steroids.2006.12.006
- Tóth, K., Somfai-Relle, S., Sugár, J., Bence, J., 1979. Carcinogenicity testing of herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyethanol containing dioxin and of pure dioxin in Swiss mice. *Nature* 278, 548–9.
- Tritscher, A.M., Mahler, J., Portier, C.J., Lucier, G.W., Walker, N.J., 2000. Induction of Lung Lesions in Female Rats Following Chronic Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Pathol.* 28, 761–769. doi:10.1177/019262330002800601
- Ueda, A., Hamadeh, H.K., Webb, H.K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. a, Lehmann, J.M., Negishi, M., 2002. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 61, 1–6.
- Urbschat, A., Paulus, P., von Quernheim, Q.F., Brück, P., Badenhop, K., Zeuzem, S., Ramos-Lopez, E., 2013. Vitamin D hydroxylases CYP2R1, CYP27B1 and CYP24A1 in renal cell carcinoma. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 1282–90. doi:10.1111/eci.12176
- USEPA, 2000. Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Related Compounds (September 2000 Draft). Part II: Health assessment of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Related Compounds. EPA/600/P-00/001 Be. National Cen, Office of Re.
- Van Birgelen, A.P., Smit, E.A., Kampen, I.M., Groeneveld, C.N., Fase, K.M., Van der Kolk, J., Poiger, H., Van den Berg, M., Koeman, J.H., Brouwer, A., 1995a. Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCBs on thyroid hormone metabolism: use in risk assessment. *Eur. J. Pharmacol.* 293, 77–85.
- Van Birgelen, A.P., Van der Kolk, J., Fase, K.M., Bol, I., Poiger, H., Brouwer, A., Van den Berg, M., 1995b. Subchronic dose-response study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 1–13.
- Van de Peppel, J., van Leeuwen, J.P.T.M., 2014. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front. Physiol.* 5, 137. doi:10.3389/fphys.2014.00137
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93, 223–41. doi:10.1093/toxsci/kfl055
- Van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H., Olson, J.R., 1994. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 24, 1–74. doi:10.3109/10408449409017919
- Van den Berg, M., Peterson, R.E., Schrenk, D., 2000. Human risk assessment and TEFs. *Food Addit. Contam.* 17, 347–58. doi:10.1080/026520300283414
- Vanden Heuvel, J.P., Clark, G.C., Thompson, C.L., McCoy, Z., Miller, C.R., Lucier, G.W., Bell, D. a, 1993. CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14, 2003–6.
- Vasiliou, V., Reuter, S.F., Kozak, C.A., Nebert, D.W., 1993. Mouse dioxin-inducible cytosolic aldehyde dehydrogenase-3: AHD4 cDNA sequence, genetic mapping, and differences in mRNA levels. *Pharmacogenetics* 3, 281–90.
- Vath, L., 2013. Diplomarbeit: Untersuchung der Genexpression in Leber und Niere von Wildtyp- und AhR-Knockout-Mäusen. Kaiserslautern.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., Bishop, J.M., 1982. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J. Virol.* 42, 773–9.
- Volanakis, J.E., Narayana, S. V, 1996. Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci.* 5, 553–64. doi:10.1002/pro.5560050401
- Vos, J.G., Moore, J.A., Zinkl, J.G., 1973. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ. Health Perspect.* 5, 149–62.

- Walker, N.J., Tritscher, a M., Sills, R.C., Lucier, G.W., Portier, C.J., 2000. Hepatocarcinogenesis in female Sprague-Dawley rats following discontinuous treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Sci.* 54, 330–7.
- Watson, J.D., Oster, S.K., Shago, M., Khosravi, F., Penn, L.Z., 2002. Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 277, 36921–30. doi:10.1074/jbc.M201493200
- Weed, R.I., Reed, C.F., Berg, G., 1963. Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes? *J. Clin. Invest.* 42, 581–8. doi:10.1172/JCI104747
- Welsh, J., Wietzke, J. a., Zinser, G.M., Smyczek, S., Romu, S., Tribble, E., Welsh, J.C., Byrne, B., Narvaez, C.J., 2002. Impact of the Vitamin D3 receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 85–92. doi:10.1016/S0960-0760(02)00277-7
- White, R.T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B.S., Lowell, B.B., Usher, P., Flier, J.S., Spiegelman, B.M., 1992. Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 267, 9210–3.
- Whitlock, J.P., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q., Li, H., 1996. Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* 10, 809–18.
- WHO, 1998. Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI).
- Wiest, W.G., Kidwell, W.R., Balogh, K., 1968. Progesterone catabolism in the rat ovary: a regulatory mechanism for pregestational potency during pregnancy. *Endocrinology* 82, 844–59. doi:10.1210/endo-82-4-844
- Wolfe, W.H., Michalek, J.E., Miner, J.C., Pirkle, J.L., Caudill, S.P., Patterson, D.G., Needham, L.L., 1994. Determinants of TCDD half-life in veterans of operation ranch hand. *J. Toxicol. Environ. Health* 41, 481–8. doi:10.1080/15287399409531858
- Wrighton, S. a, Stevens, J.C., 1992. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 1–21. doi:10.3109/10408449209145319
- Wu, C., Zhang, Y., Sun, Z., Li, P., 2008. Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence. *BMC Evol. Biol.* 8, 159. doi:10.1186/1471-2148-8-159
- Wu, C.L., Zukerberg, L.R., Ngwu, C., Harlow, E., Lees, J.A., 1995. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2536–46.
- Wu, L., Zhou, L., Chen, C., Gong, J., Xu, L., Ye, J., Li, D., Li, P., 2014. Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue. *Sci. China. Life Sci.* 57, 107–16. doi:10.1007/s11427-013-4585-y
- Xiong, M., Gong, J., Liu, Y., Xiang, R., Tan, X., 2012. Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F1107–15. doi:10.1152/ajprenal.00151.2012
- Yamamoto, K., Imamura, H., Matsuyama, Y., Kume, Y., Ikeda, H., Norman, G.L., Shums, Z., Aoki, T., Hasegawa, K., Beck, Y., Sugawara, Y., Kokudo, N., 2010. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J. Gastroenterol.* 45, 1272–82. doi:10.1007/s00535-010-0278-5
- Yang, X., Liu, D., Murray, T.J., Mitchell, G.C., Hesterman, E. V, Karchner, S.I., Merson, R.R., Hahn, M.E., Sherr, D.H., 2005. The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene* 24, 7869–81. doi:10.1038/sj.onc.1208938
- Yu, J., Lin, J.H., Wu, X.R., Sun, T.T., 1994. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J. Cell Biol.* 125, 171–82.
- Zachariasen, R.D., 1994. Loss of oral contraceptive efficacy by concurrent antibiotic administration. *Women Health* 22, 17–26. doi:10.1300/J013v22n01_02

- Zeiger, M., Haag, R., Höckel, J., Schrenk, D., Schmitz, H.J., 2001. Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol. Sci.* 63, 65–73.
- Zeng, X., Yin, F., Liu, X., Xu, J., Xu, Y., Huang, J., Nan, Y., Qiu, X., 2014. Upregulation of E2F transcription factor 3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 31, 1139–46. doi:10.3892/or.2014.2968
- Zhang, B., Dong, L.-W., Tan, Y.-X., Zhang, J., Pan, Y.-F., Yang, C., Li, M.-H., Ding, Z.-W., Liu, L.-J., Jiang, T.-Y., Yang, J.-H., Wang, H.-Y., 2013. Asparagine synthetase is an independent predictor of surgical survival and a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 109, 14–23. doi:10.1038/bjc.2013.293
- Zhang, X., Nicosia, S. V., Bai, W., 2006. Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets* 6, 229–44.
- Zhao, B., Bie, J., Wang, J., Marqueen, S. a., Ghosh, S., 2012. Identification of a novel intracellular cholesteryl ester hydrolase (carboxylesterase 3) in human macrophages: compensatory increase in its expression after carboxylesterase 1 silencing. *AJP Cell Physiol.* 303, C427–C435. doi:10.1152/ajpcell.00103.2012
- Zhao, Y.-J., Ju, Q., Li, G.-C., 2013. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol. Clin. Oncol.* 1, 593–598. doi:10.3892/mco.2013.119
- Zhu, W.-L., Fan, B.-L., Liu, D.-L., Zhu, W.-X., 2009. Abnormal expression of fibrinogen gamma (FGG) and plasma level of fibrinogen in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 29, 2531–4.

7. Anhang

7.1 Microarray

Tabelle 75: Gene, die sowohl in TCDD-behandelten AhR-Wildtyp wie auch AhR-Knockout Mäusen gemeinsam hoch-reguliert sind; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 \text{fc} \geq 1$ or ≤ -1 , p-Wert ≤ 0.05

Gen Name	Probe Name	Systematischer Name	Log2 fc AhR ^{+/+} / AhR ^{-/-}
<i>Igfbp2</i>	A_66_P135391	NM_008342	2.0 / 2.5
<i>Serpinc1</i>	A_52_P409746	NM_080844	2.0 / 1.6
<i>Zdhhc22</i>	A_55_P2097518	NM_001080943	1.8 / 1.2
<i>Fabp1</i>	A_51_P487818	NM_017399	1.7 / 1.2
<i>Ttr</i>	A_65_P19832	NM_013697	1.6 / 1.3
<i>Upp2</i>	A_52_P259817	NM_029692	1.6 / 1.5
<i>F10</i>	A_51_P174961	NM_007972	1.5 / 1.4
<i>Foxa1</i>	A_55_P2053933	NM_008259	1.5 / 2.0
<i>Hbb-b2</i>	A_55_P2038540	NM_016956	1.4 / 1.0
<i>Pdk4</i>	A_51_P350453	NM_013743	1.3 / 1.8
<i>Hba-a2</i>	A_55_P1962299	NM_001083955	1.3 / 1.0
<i>Tdo2</i>	A_52_P404341	NM_019911	1.1 / 1.0
<i>Hba-a1</i>	A_55_P1962303	NM_008218	1.0 / 1.2

Tabelle 76: In AhR-Wildtyp herunterregulierte und in AhR-defizienten Mäusen hochregulierte Gene durch Behandlung mit TCDD; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 \text{fc} \geq 1$ or ≤ -1 , p-Wert ≤ 0.05

Gen Name	Probe Name	Systematischer Name	Log2 fc AhR ^{+/+} / AhR ^{-/-}
<i>Cox6a2</i>	A_51_P509997	NM_009943	-1,114/1,122

Tabelle 77: In AhR-Wildtyp hochregulierte und in AhR-defizienten Mäusen herunterregulierte Gene durch Behandlung mit TCDD; Cut-Off Kriterien: A ≥ 7, log₂ fc ≥ 1 or ≤ -1, p-Wert ≤ 0.05

Gen Name	Probe Name	Systematischer Name	Log₂ fc AhR^{+/+} / AhR^{-/-}
<i>A130040M12Rik</i>	A_55_P1954724	NR_002860	1,093/-1,608
<i>Acaca</i>	A_55_P2084706	BC023946	1,122/-1,709
<i>Acaca</i>	A_55_P2019058	NM_133360	1,059-1,762
<i>Akr1b3</i>	A_55_P2174953	NM_009658	1,243/-1,159
<i>Amy1</i>	A_55_P1983418	NM_007446	1,333/-1,208
<i>BC054059</i>	A_55_P2042500	NM_145635	2,133/-1,861
<i>Car3</i>	A_51_P431329	NM_007606	2,314/-2,267
<i>Cd1d2</i>	A_55_P1971174	NM_007640	1,267/-1,8
<i>Cidea</i>	A_51_P199168	NM_007702	3,695/-5,061
<i>Cidec</i>	A_55_P1969128	NM_178373	2,311/-2,666
<i>Clstn3</i>	A_55_P2180744	NM_153508	1,654/-2,375
<i>Cox8b</i>	A_52_P423814	NM_007751	2,531/-4,039
<i>ENSMUST00000097840</i>	A_66_P139703	ENSMUST00000097840	1,567/-2,703
<i>Fabp4</i>	A_51_P336833	NM_024406	2,092/-1,861
<i>Fasn</i>	A_52_P100252	NM_007988	1,266/-2,15
<i>Gm2562</i>	A_55_P1960936	XM_001473982	1,005/-1,92
<i>Gm2627</i>	A_55_P2140212	XM_001474216	1,113/-1,197
<i>Gm4148</i>	A_55_P1957213	XM_001479389	1,072/-1,647
<i>Kcnk3</i>	A_52_P639402	NM_010608	2,049/-4,475
<i>LOC100189605</i>	A_55_P1974080	NM_001135127	2,461/-2,437
<i>Ly6d</i>	A_51_P343517	NM_010742	3,425/-4,241
<i>Mrap</i>	A_51_P346964	NM_029844	1,82/-4,62
<i>Mup9</i>	A_55_P1979904	NM_001126319	2,538/-2,521
<i>Pparg</i>	A_51_P106799	NM_011146	1,458/-1,341
<i>Prkar2b</i>	A_55_P2055087	NM_011158	2,207/-2,836
<i>Retn</i>	A_55_P2428514	ENSMUST00000012849	1,986/-1,765
<i>Scd1</i>	A_52_P682382	NM_009127	1,067/-1,777
<i>Sh2b2</i>	A_66_P113490	NM_018825	1,119/-1,164
<i>Thrsp</i>	A_55_P2018666	NM_009381	2,22/-2,38
<i>Ucp1</i>	A_51_P426353	NM_009463	3,651/-5,931

Tabelle 78: Alle signifikant hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$, p-Wert ≤ 0.05

A	Log2 fc	p-value	Probe name	Gene name	Systematic name	Gene description
9,68	1,103	2,00E-05	A_52_P668984	4930420K17Rik	NM_001081029	ref Mus musculus RIKEN cDNA 4930420K17 gene (4930420K17Rik)
7,02	1,137	0,00092	A_55_P2263971	6330526H18Rik	AK018221	gb Mus musculus adult male medulla oblongata cDNA
12,55	1,094	0,00147	A_55_P2177639	A_55_P2177639	A_55_P2177639	Unknown
7,67	1,054	0,00046	A_55_P2150876	Als2cr12	NM_175370	ref Mus musculus amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region
9,6	1,087	2,00E-05	A_51_P196862	Amdhd1	NM_027908	ref Mus musculus amidohydrolase domain containing 1 (Amdhd1)
10,61	1,582	0	A_51_P391159	Ang	NM_007447	ref Mus musculus angiogenin
9,44	1,096	0,00018	A_51_P179504	Ang3	NM_001123394	ref Mus musculus angiogenin
9,76	1,402	0	A_52_P98778	Ang4	NM_177544	ref Mus musculus angiogenin
13,04	1,233	0,00046	A_52_P441070	Apob	NM_009693	ref Mus musculus apolipoprotein B (Apob)
9,36	2,059	0	A_51_P100625	Apon	NM_133996	ref Mus musculus apolipoprotein N (Apon)
8,15	1,141	0,00027	A_55_P2219903	AW061147	AW061147	gb UI-M-BH1-anc-a-12-0-UI.s1 NIH_BMAP_M_S2 Mus musculus cDNA clone UI-M-BH1-anc-a-12-0-UI 3'. [AW061147]
10,85	1,227	1,00E-05	A_51_P446570	Bbox1	NM_130452	ref Mus musculus butyrobetaine (gamma)
7,56	1,024	0,00025	A_55_P2105632	BC024139	NM_001142968	ref Mus musculus cDNA sequence BC024139 (BC024139)
8,06	1,313	6,00E-05	A_55_P2000022	Ccdc151	NM_001163787	ref Mus musculus coiled-coil domain containing 151 (Ccdc151)
8,13	1,599	0,00077	A_55_P1977431	Cck	NM_031161	ref Mus musculus cholecystokinin (Cck)
9,83	2,026	0,00013	A_51_P253481	Ces1	NM_021456	ref Mus musculus carboxylesterase 1 (Ces1)
9,1	1,213	0,00049	A_51_P271865	Clec4f	NM_016751	ref Mus musculus C-type lectin domain family 4
7,46	1,13	9,00E-05	A_55_P2149288	Cmya5	NM_023821	ref Mus musculus cardiomyopathy associated 5 (Cmya5)
7,68	1,122	4,00E-05	A_51_P509997	Cox6a2	NM_009943	ref Mus musculus cytochrome c oxidase
10,97	2,422	0	A_55_P2174987	Creb3l3	NM_145365	ref Mus musculus cAMP responsive element binding protein 3-like 3 (Creb3l3)
7,59	4,566	0	A_52_P88648	Cyp24a1	NM_009996	ref Mus musculus cytochrome P450
10,31	1,213	0,00011	A_55_P2042319	Cyp2d40	NM_023623	ref Mus musculus cytochrome P450
7,98	1,015	0,00027	A_55_P1965303	Dsc2	NM_013505	ref Mus musculus desmocollin 2 (Dsc2)
8,28	1,502	0,00189	A_55_P2111322	ENSMUST00000103741	ENSMUST00000103741	ens Immunoglobulin Lambda light chain C gene segment [Source:IMGT/GENE-DB;Acc:IGLC1] [ENSMUST00000103741]

7,27	1,678	5,00E-05	A_55_P1987406	ENSMUST00000103746	ENSMUST00000103746	ens Immunoglobulin Lambda light chain V gene segment [Source:IMGT/GENE-DB;Acc:IGLV1] [ENSMUST00000103746]
7,21	1,033	0,00088	A_55_P1996008	ENSMUST00000109069	ENSMUST00000109069	ens Novel KRAB box and zinc finger
11,87	1,519	0,00043	A_51_P174961	F10	NM_007972	ref Mus musculus coagulation factor X (F10)
14,61	1,694	9,00E-05	A_51_P487818	Fabp1	NM_017399	ref Mus musculus fatty acid binding protein 1
13,47	1,843	0,00016	A_51_P428483	Fgb	NM_181849	ref Mus musculus fibrinogen beta chain (Fgb)
13,71	1,321	3,00E-05	A_51_P362176	Fgg	NM_133862	ref Mus musculus fibrinogen gamma chain (Fgg)
7,61	1,453	0,00039	A_55_P2053933	Foxa1	NM_008259	ref Mus musculus forkhead box A1 (Foxa1)
8,34	1,361	0,00011	A_55_P2134236	Foxa2	NM_010446	ref Mus musculus forkhead box A2 (Foxa2)
10,04	1,047	2,00E-05	A_66_P103092	Gm12211	XM_621250	ref PREDICTED: Mus musculus similar to RPL9 (LOC546500)
10,98	1,045	5,00E-05	A_55_P2108644	Gm12456	XM_889919	ref PREDICTED: Mus musculus similar to rat ribosomal protein L36 (LOC623045)
12,82	1,065	0,00052	A_55_P1980721	Gm16399	XM_001473516	ref PREDICTED: Mus musculus similar to cytochrome c oxidase
9,84	1,175	1,00E-05	A_55_P2109922	Gm2921	XM_001474867	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100040711 (LOC100040711)
7,14	1,319	2,00E-05	A_55_P2042184	Gm3181	XM_001476516	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100041175 (LOC100041175)
8,68	1,113	0,00061	A_55_P1989765	Gm3951	XM_001478600	ref PREDICTED: Mus musculus similar to Ubtf protein (LOC100042658)
9,65	1,168	1,00E-05	A_55_P1960738	Gm4470	XM_001472780	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100044690 (LOC100044690)
12,31	1,021	0	A_55_P2073010	Gm4832	XM_140116	ref PREDICTED: Mus musculus predicted gene
9,63	1,176	0,00038	A_66_P134704	Gm4952	NM_001013762	ref Mus musculus predicted gene 4952 (Gm4952)
9,7	1,108	4,00E-05	A_55_P2075894	Gm5215	XM_356811	ref PREDICTED: Mus musculus predicted gene
7	1,329	0,00012	A_55_P2069730	Gm5553	XM_485592	ref PREDICTED: Mus musculus predicted gene
9,3	1,22	8,00E-05	A_55_P1963134	Gm6135	XM_895691	ref PREDICTED: Mus musculus predicted gene
9,7	1,215	3,00E-05	A_52_P629037	Gm6987	XM_894492	ref PREDICTED: Mus musculus predicted gene
7,64	1,221	0,00046	A_55_P2056344	Gm9992	NM_001142539	ref Mus musculus predicted gene 9992 (Gm9992)
11,42	1,023	0,0012	A_55_P1971674	Golga7b	NM_001141983	ref Mus musculus golgi autoantigen
8,83	1,872	5,00E-05	A_66_P105270	Hao1	NM_010403	ref Mus musculus hydroxyacid oxidase 1
9,25	1,014	0,00191	A_51_P371745	Havcr1	AF399829	gb Mus musculus strain BALB/c TIM1 mRNA
15,47	1,046	0,00185	A_55_P1962303	Hba-a1	NM_008218	ref Mus musculus hemoglobin alpha
16,62	1,273	0,00017	A_55_P1962299	Hba-a2	NM_001083955	ref Mus musculus hemoglobin alpha

14,03	1,396	1,00E-04	A_55_P1973809	Hbb-b1	NM_008220	ref Mus musculus hemoglobin
12,96	1,382	1,00E-05	A_55_P2038540	Hbb-b2	NM_016956	ref Mus musculus hemoglobin
9,84	1,182	0,00024	A_55_P1992582	Hmgcs2	NM_008256	ref Mus musculus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2)
8,54	1,11	9,00E-04	A_52_P13897	Hook1	NM_030014	ref Mus musculus hook homolog 1 (Drosophila) (Hook1)
11,06	2,037	0	A_66_P135391	Igfbp2	NM_008342	ref Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2)
11,21	1,587	0,00036	A_55_P1996674	Itih3	NM_008407	ref Mus musculus inter-alpha trypsin inhibitor
10,41	1,134	0,00164	A_55_P2138739	LOC100039570	XM_001473119	ref PREDICTED: Mus musculus similar to cyclic nucleotide gated channel beta 1 (LOC100039570)
9,41	1,094	0,00101	A_55_P2179246	LOC100044553	XM_001472564	ref PREDICTED: Mus musculus similar to Adam6 protein (LOC100044553)
7,59	1,087	0,00123	A_55_P2181665	LOC100044768	XM_001473012	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100044768 (LOC100044768)
8,85	1,332	0,00067	A_55_P2183518	LOC100044930	XM_001473350	ref PREDICTED: Mus musculus similar to Ubtf protein (LOC100044930)
10,16	1,243	0	A_55_P1955244	LOC677113	XM_001000635	ref PREDICTED: Mus musculus similar to ribosomal protein S24 (LOC677113)
12,11	1,445	0,00052	A_51_P178828	Mbl2	NM_010776	ref Mus musculus mannose-binding lectin (protein C) 2 (Mbl2)
8,93	1,041	0,00087	A_55_P2096917	Mreg	NM_001005423	ref Mus musculus melanoregulin (Mreg)
8,39	1,02	6,00E-05	A_55_P2043762	N6amt1	NM_026366	ref Mus musculus N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1 (putative) (N6amt1)
9,77	1,184	7,00E-05	A_55_P2082625	NAP061666-1	NAP061666-1	Unknown
7,38	1,187	0,00021	A_55_P2061333	NAP111319-1	NAP111319-1	Unknown
8,39	1,049	0,00093	A_55_P1984416	NAP111644-1	NAP111644-1	Unknown
8,46	1,746	0,00011	A_52_P229981	Osta	NM_145932	ref Mus musculus organic solute transporter alpha (Osta)
8,95	1,463	6,00E-05	A_51_P126563	Otc	NM_008769	ref Mus musculus ornithine transcarbamylase (Otc)
10,24	1,327	0,00011	A_51_P350453	Pdk4	NM_013743	ref Mus musculus pyruvate dehydrogenase kinase
9,86	1,177	0,0018	A_55_P2009449	Pnma2	NM_175498	ref Mus musculus paraneoplastic antigen MA2 (Pnma2)
8,35	2,042	1,00E-05	A_55_P2183433	Rab30	NM_029494	ref Mus musculus RAB30
13,67	1,182	0	A_52_P466147	Rarres2	NM_027852	ref Mus musculus retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 (Rarres2)
11,7	1,368	3,00E-05	A_51_P237383	Rnase4	NM_021472	ref Mus musculus ribonuclease

11,17	1,497	0,00158	A_55_P2009217	Rnu3b1	NR_004415	ref Mus musculus U3B small nuclear RNA 1 (Rnu3b1)
16,3	1,009	0,00014	A_55_P2186672	Rps14	NM_020600	ref Mus musculus ribosomal protein S14 (Rps14)
7,3	1,127	0,00131	A_55_P2024689	Rsbn1	NM_172684	ref Mus musculus rosin
13,1	2,009	0,00023	A_52_P409746	Serpinc1	NM_080844	ref Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor
9,22	1,545	0,00011	A_55_P1974740	Slc13a1	NM_019481	ref Mus musculus solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters)
8,19	1,501	2,00E-05	A_55_P2094019	Slc17a4	NM_177016	ref Mus musculus solute carrier family 17 (sodium phosphate)
7,2	1,102	0,00165	A_55_P1983968	Slc24a6	NM_133221	ref Mus musculus solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger)
10,84	1,028	0,0012	A_51_P514405	Slc2a5	NM_019741	ref Mus musculus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)
8,6	1,229	4,00E-05	A_51_P509643	Snca	NM_001042451	ref Mus musculus synuclein
10,12	1,144	7,00E-04	A_52_P404341	Tdo2	NM_019911	ref Mus musculus tryptophan 2
8,96	1,159	1,00E-05	A_55_P2053459	Timd2	NM_001161355	ref Mus musculus T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2 (Timd2)
14,01	1,648	0,00013	A_65_P19832	Ttr	NM_013697	ref Mus musculus transthyretin (Ttr)
11,96	1,23	0	A_51_P102438	Ugt2b36	NM_001029867	ref Mus musculus UDP glucuronosyltransferase 2 family
10,22	1,646	1,00E-05	A_52_P259817	Upp2	NM_029692	ref Mus musculus uridine phosphorylase 2 (Upp2)
8,8	1,801	0	A_55_P2097518	Zdhhc22	NM_001080943	ref Mus musculus zinc finger

Tabelle 79: Alle signifikant herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-defizienter-Mäuse; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \leq -1$, p-Wert ≤ 0.05

A	Log2 fc	p-value	Probe name	Gene name	Systematic name	Gene description
7,54	-1,073	9,00E-05	A_51_P328489	1700025G04Rik	NM_197990	ref Mus musculus RIKEN cDNA 1700025G04 gene (1700025G04Rik)
7,24	-1,525	0	A_55_P2149363	6430548M08Rik	NM_172286	ref Mus musculus RIKEN cDNA 6430548M08 gene (6430548M08Rik)
13,16	-1,608	1,00E-05	A_55_P1954724	A130040M12Rik	NR_002860	ref Mus musculus RIKEN cDNA A130040M12 gene (A130040M12Rik)
10,06	-1,028	0,00084	A_52_P665675	Abca1	NM_013454	ref Mus musculus ATP-binding cassette
8,57	-1,025	0,00047	A_51_P245368	Abcb1b	NM_011075	ref Mus musculus ATP-binding cassette
11,8	-1,709	2,00E-05	A_55_P2084706	Acaca	BC023946	gb Mus musculus acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha
12,02	-1,762	1,00E-05	A_55_P2019058	Acaca	NM_133360	ref Mus musculus acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (Acaca)
13,71	-1,518	0	A_55_P2025954	Acly	NM_134037	ref Mus musculus ATP citrate lyase (Acly)

11,54	-1,051	1,00E-05	A_55_P1983177	Acs14	NM_207625	ref Mus musculus acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (Acs14)
9,68	-1,202	0,00087	A_55_P1972104	Acsm3	NM_212441	ref Mus musculus acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3 (Acsm3)
7,68	-1,177	0,0013	A_51_P367780	Adamts12	NM_029981	ref Mus musculus ADAMTS-like 2 (Adamts12)
9,72	-1,326	0	A_55_P2151546	Adarb1	NM_001024837	ref Mus musculus adenosine deaminase
14,99	-2,334	0	A_52_P629895	Adh1	NM_007409	ref Mus musculus alcohol dehydrogenase 1 (class I) (Adh1)
7,1	-2,355	5,00E-04	A_55_P1992849	Adrb3	NM_013462	ref Mus musculus adrenergic receptor
11,4	-1,021	0,00014	A_55_P2035662	Aebp1	NM_009636	ref Mus musculus AE binding protein 1 (Aebp1)
12,52	-1,203	0,00049	A_55_P2043287	Aes	NM_010347	ref Mus musculus amino-terminal enhancer of split (Aes)
11,07	-1,428	0,00015	A_55_P2125947	Agpat2	NM_026212	ref Mus musculus 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase
12,45	-1,098	0,00024	A_55_P2068812	AK203298	AK203298	gb Mus musculus cDNA
8,56	-1,159	1,00E-04	A_55_P2174953	Akr1b3	NM_009658	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
9,2	-7,244	0	A_51_P331288	Akr1b7	NM_009731	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
9,73	-2,692	0	A_51_P128987	Akr1b8	NM_008012	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
8,75	-1,139	0,00037	A_55_P2147136	Akr1d1	NM_145364	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
8,82	-1,024	0,00054	A_55_P2066523	Akt2	NM_001110208	ref Mus musculus thymoma viral proto-oncogene 2 (Akt2)
9,33	-1,105	9,00E-05	A_55_P1963031	Ampd2	NM_028779	ref Mus musculus adenosine monophosphate deaminase 2 (isoform L) (Ampd2)
10,42	-1,208	0,00034	A_55_P1983418	Amy1	NM_007446	ref Mus musculus amylase 1
9,38	-2,295	8,00E-05	A_51_P333111	Aox1	NM_009676	ref Mus musculus aldehyde oxidase 1 (Aox1)
8,39	-1,087	0,00085	A_55_P1959748	Asns	NM_012055	ref Mus musculus asparagine synthetase (Asns)
7,36	-1,1	0,00027	A_52_P300445	Atp4a	NM_018731	ref Mus musculus ATPase
7,24	-3,032	0	A_55_P2274378	AW549542	AK035112	gb Mus musculus 12 days embryo embryonic body between diaphragm region and neck cDNA
8,31	-1,118	1,00E-05	A_55_P2090557	BC046404	NM_198861	ref Mus musculus cDNA sequence BC046404 (BC046404)
7,26	-1,861	0,00165	A_55_P2042500	BC054059	NM_145635	ref Mus musculus cDNA sequence BC054059 (BC054059)
9,6	-1,073	0,00044	A_52_P162486	Bgn	NM_007542	ref Mus musculus biglycan (Bgn)
8,23	-1,114	0,00079	A_52_P466853	Bmyc	NM_023326	ref Mus musculus brain expressed myelocytomatosis oncogene (Bmyc)
8,9	-1,096	2,00E-05	A_52_P114260	C1rb	NM_001113356	ref Mus musculus complement component 1
12,53	-1,448	9,00E-05	A_55_P2078633	C4b	NM_009780	ref Mus musculus complement component 4B (Childo blood group)

						(C4b)
8,52	-1,97	0	A_55_P2066180	C630004H02Rik	NM_175454	ref Mus musculus RIKEN cDNA C630004H02 gene (C630004H02Rik)
7,86	-1,683	0	A_55_P2113439	Caln1	NM_021371	ref Mus musculus calneuron 1 (Caln1)
9,71	-1,014	0,00025	A_51_P355151	Camk2n2	NM_028420	ref Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2 (Camk2n2)
13,87	-2,267	0,00037	A_51_P431329	Car3	NM_007606	ref Mus musculus carbonic anhydrase 3 (Car3)
10,34	-1,421	1,00E-05	A_51_P133582	Cbx4	NM_007625	ref Mus musculus chromobox homolog 4 (Drosophila Pc class) (Cbx4)
7,53	-1,146	0,00111	A_51_P286737	Ccl2	NM_011333	ref Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2)
8,36	-2,366	0	A_52_P53906	Ccnd2	NM_009829	ref Mus musculus cyclin D2 (Ccnd2)
12,03	-2,784	0	A_51_P517430	Cd1d1	NM_007639	ref Mus musculus CD1d1 antigen (Cd1d1)
9,81	-1,8	0	A_55_P1971174	Cd1d2	NM_007640	ref Mus musculus CD1d2 antigen (Cd1d2)
7,72	-2,026	1,00E-05	A_55_P2064043	Cd44	NM_009851	ref Mus musculus CD44 antigen (Cd44)
10,27	-1,287	0	A_51_P339540	Cdkn1c	NM_009876	ref Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57) (Cdkn1c)
8,14	-3,007	0	A_52_P891775	Cdr2l	NM_001080929	ref Mus musculus cerebellar degeneration-related protein 2-like (Cdr2l)
9,36	-1,815	0,00018	A_51_P134812	Chac1	NM_026929	ref Mus musculus ChaC
7,01	-5,919	0	A_51_P358316	Chga	NM_007693	ref Mus musculus chromogranin A (Chga)
8,27	-5,061	0	A_51_P199168	Cidea	NM_007702	ref Mus musculus cell death-inducing DNA fragmentation factor
7,34	-2,666	0,00023	A_55_P1969128	Cidec	NM_178373	ref Mus musculus cell death-inducing DFFA-like effector c (Cidec)
8,23	-2,375	0	A_55_P2180744	Clstn3	NM_153508	ref Mus musculus calyntenin 3 (Clstn3)
15,6	-1,319	0	A_55_P2017929	Clu	NM_013492	ref Mus musculus clusterin (Clu)
7,7	-2,373	1,00E-05	A_51_P241995	Col5a3	NM_016919	ref Mus musculus collagen
9,59	-1,371	3,00E-04	A_55_P2128153	Col6a1	NM_009933	ref Mus musculus collagen
7,5	-1,467	0,00012	A_51_P279639	Col6a2	NM_146007	ref Mus musculus collagen
8,63	-4,039	0	A_52_P423814	Cox8b	NM_007751	ref Mus musculus cytochrome c oxidase
9,4	-2,62	0,00121	A_55_P2024704	Cpe	NM_013494	ref Mus musculus carboxypeptidase E (Cpe)
9,06	-1,111	1,00E-05	A_51_P304397	Cpm	NM_027468	ref Mus musculus carboxypeptidase M (Cpm)
9,31	-1,343	3,00E-05	A_52_P460957	Crem	NM_013498	ref Mus musculus cAMP responsive element modulator (Crem)
8,26	-1,133	2,00E-05	A_55_P2122555	Csnk1e	NM_013767	ref Mus musculus casein kinase 1
12,82	-2,403	0,00174	A_55_P2076196	CU041261.1	NM_001134644	ref Mus musculus major urinary protein LOC100048885

						(LOC100048885)
7,16	-7,383	0	A_55_P2156963	Cyp11b1	NM_001033229	ref Mus musculus cytochrome P450
9,51	-4,56	0	A_55_P2140107	Cyp21a1	NM_009995	ref Mus musculus cytochrome P450
14,26	-1,702	2,00E-05	A_55_P1966690	Cyp2e1	NM_021282	ref Mus musculus cytochrome P450
12,68	-3,391	0	A_51_P453909	Cyp2f2	NM_007817	ref Mus musculus cytochrome P450
7,85	-1,145	0,00021	A_55_P2067942	D16Ert472e	NM_025967	ref Mus musculus DNA segment
10,95	-1,345	0,00012	A_51_P148675	Dag1	NM_010017	ref Mus musculus dystroglycan 1 (Dag1)
13,73	-1,343	0,00025	A_51_P334104	Dcn	NM_007833	ref Mus musculus decorin (Dcn)
9,66	-2,401	4,00E-05	A_55_P2022337	Dhcr7	NM_007856	ref Mus musculus 7-dehydrocholesterol reductase (Dhcr7)
12,14	-1,165	1,00E-05	A_55_P2039071	Dhdh	NM_027903	ref Mus musculus dihydrodiol dehydrogenase (dimeric) (Dhdh)
10,89	-1,044	0,00061	A_55_P2046657	Dio1	NM_007860	ref Mus musculus deiodinase
12,58	-1,075	3,00E-05	A_51_P273679	Dmgdh	NM_028772	ref Mus musculus dimethylglycine dehydrogenase precursor (Dmgdh)
8,17	-1,87	0	A_51_P436817	Dos	NM_015761	ref Mus musculus downstream of Stk11 (Dos)
13,63	-1,211	2,00E-05	A_51_P405397	Ecml	NM_007899	ref Mus musculus extracellular matrix protein 1 (Ecml)
8,67	-1,938	0	A_51_P446510	Emp3	NM_010129	ref Mus musculus epithelial membrane protein 3 (Emp3)
10,12	-1,019	0,00034	A_55_P2040936	Eng	NM_001146350	ref Mus musculus endoglin (Eng)
7,54	-1,563	0,00023	A_55_P2308283	ENSMUSG00000072890	AK144909	gb Mus musculus mammary gland RCB-0526 Jyg-MC(A) cDNA
8,05	-2,703	0	A_66_P139703	ENSMUST00000097840	ENSMUST00000097840	ens Putative uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q3UXI1] [ENSMUST00000097840]
8	-1,508	0,00022	A_55_P1978636	ENSMUST00000099035	ENSMUST00000099035	tc Q4YHF0_PLABE (Q4YHF0) Pb-fam-2 protein (Fragment)
8,98	-1,684	0,00045	A_55_P2093862	ENSMUST00000099037	ENSMUST00000099037	Unknown
8,57	-1,635	0,00029	A_55_P2165554	ENSMUST00000099046	ENSMUST00000099046	Unknown
9,45	-1,788	6,00E-05	A_55_P2138100	ENSMUST00000099050	ENSMUST00000099050	Unknown
9,04	-1,753	0,00058	A_55_P2465382	ENSMUST00000099683	ENSMUST00000099683	Unknown
7,33	-2,114	0	A_55_P2143251	ENSMUST00000105034	ENSMUST00000105034	ens Putative uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q3TQL3] [ENSMUST00000105034]
10,03	-1,278	0,00024	A_55_P2145833	ENSMUST00000108472	ENSMUST00000108472	ens Myotonin-protein kinase (EC 2.7.11.1)(Myotonic dystrophy protein kinase)(MDPK)(DM-kinase)(DMK)(DMPK)(MT-PK) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P54265] [ENSMUST00000108472]
8,15	-2,011	0	A_55_P2027831	ENSMUST00000112385	ENSMUST00000112385	ens Beta-crystallin A4 (Beta-A4 crystallin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JJV0]

						[ENSMUST00000112385]
10,15	-1,137	1,00E-04	A_52_P257625	Esm1	NM_023612	ref Mus musculus endothelial cell-specific molecule 1 (Esm1)
12,27	-1,861	0,00014	A_51_P336833	Fabp4	NM_024406	ref Mus musculus fatty acid binding protein 4
11,34	-1,009	0,00029	A_51_P358112	Fads1	NM_146094	ref Mus musculus fatty acid desaturase 1 (Fads1)
10,87	-1,423	4,00E-05	A_65_P20641	Fads2	ENSMUST00000025567	ens Fatty acid desaturase 2 (EC 1.14.19.-)(Delta(6) fatty acid desaturase)(Delta(6) desaturase)(D6D) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z0R9] [ENSMUST00000025567]
9,53	-1,383	1,00E-05	A_66_P130115	Fads2	NM_019699	ref Mus musculus fatty acid desaturase 2 (Fads2)
8,26	-1,71	1,00E-05	A_55_P2269819	Fam107a	NM_183187	ref Mus musculus family with sequence similarity 107
7,35	-1,595	0	A_55_P2083489	Fam129a	NM_022018	ref Mus musculus family with sequence similarity 129
9,2	-1,129	0,00144	A_52_P243516	Fam82a1	NM_201361	ref Mus musculus family with sequence similarity 82
8,82	-2,15	1,00E-05	A_52_P100252	Fasn	NM_007988	ref Mus musculus fatty acid synthase (Fasn)
8,71	-1,126	0,00087	A_51_P137604	Fcna	NM_007995	ref Mus musculus ficolin A (Fcna)
14,61	-1,909	0	A_55_P2059890	Fdx1	NM_007996	ref Mus musculus ferredoxin 1 (Fdx1)
11,04	-2,001	0	A_51_P461578	Fdxr	NM_007997	ref Mus musculus ferredoxin reductase (Fdxr)
8,22	-1,061	1,00E-05	A_51_P117739	Figf	NM_010216	ref Mus musculus c-fos induced growth factor (Figf)
7,17	-1,575	8,00E-04	A_51_P286748	Frzb	NM_011356	ref Mus musculus frizzled-related protein (Frzb)
9,49	-2,215	1,00E-05	A_52_P472302	Fxyd6	NM_022004	ref Mus musculus FXYD domain-containing ion transport regulator 6 (Fxyd6)
10,75	-1,034	7,00E-04	A_51_P187082	G6pdx	NM_008062	ref Mus musculus glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked (G6pdx)
8,96	-1,798	0	A_52_P1197913	Gadd45b	NM_008655	ref Mus musculus growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (Gadd45b)
8,29	-2,397	0	A_51_P411917	Gata6	NM_010258	ref Mus musculus GATA binding protein 6 (Gata6)
11,66	-2,405	1,00E-05	A_55_P2106175	Gch1	NM_008102	ref Mus musculus GTP cyclohydrolase 1 (Gch1)
13,51	-1,243	0,00035	A_51_P365019	Gclc	NM_010295	ref Mus musculus glutamate-cysteine ligase
8,12	-1,478	1,00E-05	A_51_P185247	Gdf10	NM_145741	ref Mus musculus growth differentiation factor 10 (Gdf10)
7,22	-1,336	0	A_55_P1968703	Gfra2	NM_008115	ref Mus musculus glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2 (Gfra2)
11,11	-1,085	0,00081	A_55_P2039712	Gigyf2	NM_146112	ref Mus musculus GRB10 interacting GYF protein 2 (Gigyf2)
10,24	-1,187	7,00E-05	A_55_P2107785	Gm13105	XM_001475876	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100041144)
9,3	-1,054	0,00064	A_66_P105032	Gm13889	NM_001145034	ref Mus musculus predicted gene 13889 (Gm13889)
11,63	-1,304	5,00E-05	A_55_P2009861	Gm2015	XM_001472138	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein

						(LOC100039039)
10,94	-1,082	0,00056	A_55_P2007495	Gm2034	XM_001472204	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100039073)
9,33	-1,766	5,00E-05	A_55_P2007496	Gm2045	XM_001472254	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100039096)
13,13	-1,675	1,00E-05	A_55_P2124461	Gm2251	XM_001472850	ref PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein
12,83	-1,734	0	A_55_P2105843	Gm2371	XM_001472740	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100044629)
14,27	-1,92	0	A_55_P1960936	Gm2562	XM_001473982	ref PREDICTED: Mus musculus similar to Ubtf protein (LOC100040033)
14,73	-2,234	0	A_55_P1954092	Gm2563	XM_001473985	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100040034)
13,33	-1,197	0,00027	A_55_P2140212	Gm2627	XM_001474216	ref PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein (LOC100040148)
11,7	-1,927	3,00E-05	A_55_P1998811	Gm3430	XM_001476688	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100041612)
9,76	-1,952	8,00E-05	A_55_P2159485	Gm3459	XM_001476778	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100041663)
12	-2,489	0	A_55_P2036240	Gm3804	XM_001478041	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100042361)
8,86	-1,076	0,00033	A_55_P2093665	Gm3950	XM_001478701	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100042656 (LOC100042656)
11,29	-1,006	0,00073	A_55_P2114318	Gm4080	XM_001478955	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100042868)
12,94	-1,647	1,00E-05	A_55_P1957213	Gm4148	XM_001479389	ref PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein (LOC100042984)
12,04	-1,958	0	A_55_P2090505	Gm4382	XM_001480011	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100043353)
10,88	-1,649	0,00012	A_55_P2051596	Gm4499	XM_001479558	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100048118)
7,51	-2,41	0	A_55_P2063426	Gm5649	XR_004815	gb PREDICTED: Mus musculus similar to Aldo-keto reductase family 1
7,86	-1,554	1,00E-05	A_55_P2100645	Gpha2	NM_130453	ref Mus musculus glycoprotein hormone alpha 2 (Gpha2)
7,86	-1,355	0,00015	A_51_P173709	Gprc5b	NM_022420	ref Mus musculus G protein-coupled receptor

12,03	-1,372	0,0011	A_55_P2013948	Gsn	NM_146120	ref Mus musculus gelsolin (Gsn)
14,29	-1,63	0	A_51_P288341	Hpd	NM_008277	ref Mus musculus 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase (Hpd)
7,6	-7,519	0	A_55_P2087805	Hsd3b1	NM_008293	ref Mus musculus hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase
8,97	-2,832	0	A_52_P253567	Hsd3b6	NM_013821	ref Mus musculus hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase
10,8	-2,359	0	A_51_P464387	Hspb8	NM_030704	ref Mus musculus heat shock protein 8 (Hspb8)
7,3	-3,04	1,00E-05	A_55_P2118173	Igf2	NM_010514	ref Mus musculus insulin-like growth factor 2 (Igf2)
7,36	-1,936	0,00019	A_66_P116635	Igf2as	NR_002855	ref Mus musculus insulin-like growth factor 2
10,26	-1,018	0,00094	A_52_P281702	Igfbp5	NM_010518	ref Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5)
8,9	-1,148	0	A_51_P382970	Itga9	NM_133721	ref Mus musculus integrin alpha 9 (Itga9)
10,37	-1,577	1,00E-05	A_51_P267370	Itm2c	NM_022417	ref Mus musculus integral membrane protein 2C (Itm2c)
9,67	-1,448	1,00E-05	A_55_P2177273	Kcna6	BC048782	gb Mus musculus potassium voltage-gated channel
7,38	-4,475	0	A_52_P639402	Kcnk3	NM_010608	ref Mus musculus potassium channel
9,34	-2,261	0	A_51_P309854	Kcnn2	NM_080465	ref Mus musculus potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel
10,41	-1,327	5,00E-05	A_51_P316553	Kdr	NM_010612	ref Mus musculus kinase insert domain protein receptor (Kdr)
7,11	-1,403	2,00E-05	A_55_P2126192	Lgr5	NM_010195	ref Mus musculus leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5 (Lgr5)
12,6	-2,051	0	A_55_P1978866	LOC100039402	XM_001472829	ref PREDICTED: Mus musculus similar to pol protein (LOC100039402)
14,45	-2,437	0,00119	A_55_P1974080	LOC100189605	NM_001135127	ref Mus musculus major urinary protein 17 (LOC100189605)
10,67	-1,534	0,00016	A_51_P193794	Lrp1	NM_008512	ref Mus musculus low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1)
7,08	-2,747	0	A_51_P392303	Lrrn3	NM_010733	ref Mus musculus leucine rich repeat protein 3
8,5	-1,145	0,00135	A_55_P2091284	Ltbp3	NM_008520	ref Mus musculus latent transforming growth factor beta binding protein 3 (Ltbp3)
9,95	-1,511	0	A_55_P2033500	Ltbp4	NM_175641	ref Mus musculus latent transforming growth factor beta binding protein 4 (Ltbp4)
9,23	-4,241	0	A_51_P343517	Ly6d	NM_010742	ref Mus musculus lymphocyte antigen 6 complex
8,41	-1,351	2,00E-05	A_55_P2047155	Meis2	NM_001159569	ref Mus musculus Meis homeobox 2 (Meis2)
10,62	-1,279	0	A_51_P129317	Mobkl3	NM_025283	ref Mus musculus MOB1
10,59	-4,62	0	A_51_P346964	Mrap	NM_029844	ref Mus musculus melanocortin 2 receptor accessory protein (Mrap)
13,16	-2,521	0,00178	A_55_P1979904	Mup9	NM_001126319	ref Mus musculus major urinary protein 9 (Mup9)

10,26	-1,083	0,00031	A_55_P2157627	NAP000319-003	NAP000319-003	Unknown
12,94	-1,107	0,00046	A_55_P2030183	NAP112908-1	NAP112908-1	tc Q5T7C3_HUMAN (Q5T7C3) High-mobility group box 1
9,7	-1,172	0,00022	A_55_P2157307	NAP113386-1	NAP113386-1	Unknown
7,47	-1,665	0	A_52_P451644	Ndn	NM_010882	ref Mus musculus necdin (Ndn)
7,48	-1,052	6,00E-04	A_51_P181341	Necab2	NM_054095	ref Mus musculus N-terminal EF-hand calcium binding protein 2 (Necab2)
7,99	-1,349	5,00E-05	A_55_P1967736	Nkd1	NM_027280	ref Mus musculus naked cuticle 1 homolog (Drosophila) (Nkd1)
7,73	-1,201	6,00E-05	A_55_P2074281	Nr2f1	NM_010151	ref Mus musculus nuclear receptor subfamily 2
10,93	-3,24	0	A_51_P239654	Nr4a1	NM_010444	ref Mus musculus nuclear receptor subfamily 4
9,13	-3,328	0	A_55_P2076560	Nr5a1	NM_139051	ref Mus musculus nuclear receptor subfamily 5
8,98	-1,054	1,00E-04	A_51_P191782	Olfml3	NM_133859	ref Mus musculus olfactomedin-like 3 (Olfml3)
7,6	-1,495	0,00069	A_51_P311958	Orm3	NM_013623	ref Mus musculus orosomucoid 3 (Orm3)
8,61	-1,564	1,00E-05	A_51_P114693	Parm1	NM_145562	ref Mus musculus prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 (Parm1)
8,11	-1,149	0,00183	A_55_P1968982	Pbx3	NM_016768	ref Mus musculus pre B-cell leukemia transcription factor 3 (Pbx3)
12,8	-1,312	4,00E-05	A_55_P2020577	Pcolce	NM_008788	ref Mus musculus procollagen C-endopeptidase enhancer protein (Pcolce)
10,33	-1,027	4,00E-05	A_55_P1983754	Pcp4l1	NM_025557	ref Mus musculus Purkinje cell protein 4-like 1 (Pcp4l1)
8,64	-1,845	1,00E-05	A_52_P496202	Pcsk1n	NM_013892	ref Mus musculus proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor (Pcsk1n)
7,88	-2,39	0	A_52_P544043	Pcsk5	NM_001163144	ref Mus musculus proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (Pcsk5)
11,13	-1,952	0,00036	A_51_P195958	Phlda1	NM_009344	ref Mus musculus pleckstrin homology-like domain
11,61	-1,137	0,00064	A_55_P2060107	Pkm2	NM_011099	ref Mus musculus pyruvate kinase
11,43	-1,204	0,00013	A_55_P1966332	Plac9	NM_207229	ref Mus musculus placenta specific 9 (Plac9)
9,22	-2,172	1,00E-05	A_51_P495780	Plin4	NM_020568	ref Mus musculus perilipin 4 (Plin4)
9,59	-1,038	0,00191	A_55_P2049186	Plvap	NM_032398	ref Mus musculus plasmalemma vesicle associated protein (Plvap)
7,63	-4,691	0	A_51_P513153	Pnmt	NM_008890	ref Mus musculus phenylethanolamine-N-methyltransferase (Pnmt)
11,22	-1,152	0,00028	A_55_P2024555	Ppap2a	NM_008903	ref Mus musculus phosphatidic acid phosphatase type 2A (Ppap2a)
9,72	-1,341	0,00014	A_51_P106799	Pparg	NM_011146	ref Mus musculus peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)
8,57	-2,836	0	A_55_P2055087	Prkar2b	NM_011158	ref Mus musculus protein kinase
7,94	-2,792	0	A_51_P382152	Procr	NM_011171	ref Mus musculus protein C receptor

9,37	-1,115	0,00012	A_55_P2090633	Ptp4a1	NM_011200	ref Mus musculus protein tyrosine phosphatase 4a1 (Ptp4a1)
9,74	-1,093	6,00E-05	A_55_P1991985	Ptprs	NM_011218	ref Mus musculus protein tyrosine phosphatase
11,29	-1,001	0,00189	A_51_P237752	Ptrf	NM_008986	ref Mus musculus polymerase I and transcript release factor (Ptrf)
8,32	-1,169	2,00E-05	A_55_P1961913	Pygm	NM_011224	ref Mus musculus muscle glycogen phosphorylase (Pygm)
9,63	-1,522	0	A_51_P305437	Rcn1	NM_009037	ref Mus musculus reticulocalbin 1 (Rcn1)
7,97	-1,765	0,00183	A_55_P2428514	Retn	ENSMUST00000012849	ens Resistin Precursor (Cysteine-rich secreted protein FIZZ3)(Adipose tissue-specific secretory factor)(ADSF)(Adipose-specific cysteine-rich secreted protein A12-alpha) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99P87] [ENSMUST00000012849]
11,01	-1,767	0	A_55_P2109857	Rgs2	NM_009061	ref Mus musculus regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)
7,53	-2,05	0	A_55_P1985070	Robo1	NM_019413	ref Mus musculus roundabout homolog 1 (Drosophila) (Robo1)
8,1	-1,384	0,00014	A_55_P2163659	Rspo3	NM_028351	ref Mus musculus R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis) (Rspo3)
8,12	-1,224	0,00028	A_52_P573336	Sbsn	NM_172205	ref Mus musculus suprabasin (Sbsn)
11,31	-3,919	0	A_55_P1954021	Scarb1	NM_016741	ref Mus musculus scavenger receptor class B
14,98	-1,777	0	A_52_P682382	Scd1	NM_009127	ref Mus musculus stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (Scd1)
10,14	-1,387	0,00051	A_51_P129464	Scd2	NM_009128	ref Mus musculus stearoyl-Coenzyme A desaturase 2 (Scd2)
8,77	-1,039	0,00026	A_55_P2099594	Scd3	NM_024450	ref Mus musculus stearoyl-coenzyme A desaturase 3 (Scd3)
9,1	-2,051	0	A_52_P282741	Sdc3	NM_011520	ref Mus musculus syndecan 3 (Sdc3)
8	-1,164	0,00055	A_66_P113490	Sh2b2	NM_018825	ref Mus musculus SH2B adaptor protein 2 (Sh2b2)
8,15	-1,301	0,00161	A_51_P445985	Slc12a3	NM_019415	ref Mus musculus solute carrier family 12
7,33	-2,021	5,00E-05	A_52_P286520	Slc23a2	NM_018824	ref Mus musculus solute carrier family 23 (nucleobase transporters)
7,65	-1,145	0,00052	A_55_P2099650	Slc24a3	NM_053195	ref Mus musculus solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger)
7,61	-1,569	4,00E-05	A_52_P515057	Slc25a24	NM_172685	ref Mus musculus solute carrier family 25 (mitochondrial carrier)
9,38	-1,325	0,00046	A_51_P224164	Slc26a4	NM_011867	ref Mus musculus solute carrier family 26
8,04	-1,591	0,00021	A_55_P1958597	Slc27a3	NM_011988	ref Mus musculus solute carrier family 27 (fatty acid transporter)
13,07	-1,202	6,00E-05	A_51_P139030	Slc38a3	NM_023805	ref Mus musculus solute carrier family 38
8,3	-2,008	0	A_66_P106661	Slc7a1	NM_007513	ref Mus musculus solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter)
7,19	-1,27	0,00116	A_52_P296996	Slc9a8	NM_148929	ref Mus musculus solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger)
8,91	-2,903	0,00023	A_51_P443403	Smoc1	NM_022316	ref Mus musculus SPARC related modular calcium binding 1 (Smoc1)
7,95	-1,181	0,00051	A_52_P78373	Sorbs3	NM_011366	ref Mus musculus sorbin and SH3 domain containing 3 (Sorbs3)

12,79	-2,216	0	A_55_P2033120	Srxn1	NM_029688	ref Mus musculus sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae) (Srxn1)
11,46	-1,648	0	A_51_P483473	St3gal5	NM_011375	ref Mus musculus ST3 beta-galactoside alpha-2
7,67	-7,8	0	A_52_P165654	Star	NM_011485	ref Mus musculus steroidogenic acute regulatory protein (Star)
8,1	-1,1	1,00E-05	A_65_P00601	Stat6	NM_009284	ref Mus musculus signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6)
7,54	-2,352	0	A_55_P2058957	Syt1	NM_009306	ref Mus musculus synaptotagmin I (Syt1)
9,92	-1,023	6,00E-04	A_51_P214107	Tbc1d20	NM_024196	ref Mus musculus TBC1 domain family
10,56	-2,986	0	A_55_P1969002	Tbx3	NM_011535	ref Mus musculus T-box 3 (Tbx3)
8,96	-4,126	0	A_55_P2275249	Th	NM_009377	ref Mus musculus tyrosine hydroxylase (Th)
13,31	-2,38	1,00E-05	A_55_P2018666	Thrsp	NM_009381	ref Mus musculus thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus) (Thrsp)
12,03	-1,267	0,00079	A_52_P540219	Timp2	NM_011594	ref Mus musculus tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)
8,71	-1,107	0,00028	A_55_P2140941	Tinag1l	NM_023476	ref Mus musculus tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 (Tinag1l)
7,98	-1,046	0,00087	A_51_P418116	Tmem119	NM_146162	ref Mus musculus transmembrane protein 119 (Tmem119)
7,59	-2,54	1,00E-05	A_51_P171107	Tmem35	NM_026239	ref Mus musculus transmembrane protein 35 (Tmem35)
7,06	-2,1	0	A_51_P215038	Tmem59l	NM_182991	ref Mus musculus transmembrane protein 59-like (Tmem59l)
7,47	-1,931	0	A_55_P2012439	Tnfrsf19	NM_013869	ref Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily
8,86	-1,413	4,00E-05	A_55_P1989296	Tnxb	NM_031176	ref Mus musculus tenascin XB (Tnxb)
7,27	-1,053	0,00011	A_51_P508115	Trank1	NM_001164659	ref Mus musculus tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1 (Trank1)
10,03	-1,787	4,00E-05	A_51_P421140	Tubb6	NM_026473	ref Mus musculus tubulin
7,32	-1,098	6,00E-05	A_55_P2167733	U2af2	NM_133671	ref Mus musculus U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 2 (U2af2)
7,6	-5,931	0	A_51_P426353	Ucp1	NM_009463	ref Mus musculus uncoupling protein 1 (mitochondrial
9,21	-1,65	1,00E-05	A_51_P265374	Vnn3	NM_011979	ref Mus musculus vanin 3 (Vnn3)
13,38	-2,181	0	A_55_P2071952	Wdr92	NM_178909	ref Mus musculus WD repeat domain 92 (Wdr92)
7,66	-1,393	1,00E-05	A_55_P2048358	Wfdc16	NM_001012723	ref Mus musculus WAP four-disulfide core domain 16 (Wfdc16)
10,32	-1,036	0,0011	A_52_P555723	Ywhag	NM_018871	ref Mus musculus tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein

Tabelle 80: Alle signifikant hochregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \geq 1$, p-Wert ≤ 0.05

A	Log2 fc	p-value	Probe name	Gene name	Systematic name	Gene description
11,4	1,139	0	A_51_P502872	2200002D01Rik	NM_028179	ref Mus musculus RIKEN cDNA 2200002D01 gene (2200002D01Rik)
7,04	1,243	0,00023	A_55_P2096174	5830473C10Rik	XM_974412	ref PREDICTED: Mus musculus similar to LOC360919 protein (LOC622307)
9,61	1,173	2,00E-05	A_55_P1953377	A_55_P1953377	A_55_P1953377	Unknown
13,16	1,093	0,00021	A_55_P1954724	A130040M12Rik	NR_002860	ref Mus musculus RIKEN cDNA A130040M12 gene (A130040M12Rik)
11,8	1,122	6,00E-04	A_55_P2084706	Acaca	BC023946	gb Mus musculus acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha
12,02	1,059	0,00066	A_55_P2019058	Acaca	NM_133360	ref Mus musculus acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (Acaca)
7,77	1,056	0,00102	A_55_P2104532	Acacb	NM_133904	ref Mus musculus acetyl-Coenzyme A carboxylase beta (Acacb)
7,8	2,934	0,00081	A_51_P458451	Adipoq	NM_009605	ref Mus musculus adiponectin
11,55	1,749	0,00089	A_52_P10041	Akr1b3	NM_009658	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
9,69	1,014	0,00097	A_51_P128987	Akr1b8	NM_008012	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
10,74	1,088	4,00E-05	A_51_P327451	Alas2	NM_009653	ref Mus musculus aminolevulinic acid synthase 2
9,5	1,031	0,00015	A_55_P2101216	Aldh3a1	NM_007436	ref Mus musculus aldehyde dehydrogenase family 3
7,69	1,403	4,00E-05	A_52_P375312	Amica1	NM_001005421	ref Mus musculus adhesion molecule
10,42	1,333	0,00015	A_55_P1983418	Amy1	NM_007446	ref Mus musculus amylase 1
8,4	2,474	0,00019	A_51_P349888	Ang2	NM_007449	ref Mus musculus angiogenin
14,08	1,177	1,00E-05	A_51_P338443	Angptl4	NM_020581	ref Mus musculus angiopoietin-like 4 (Angptl4)
7,06	1,268	0,00173	A_51_P207591	Anxa8	NM_013473	ref Mus musculus annexin A8 (Anxa8)
7,56	1,232	0,00082	A_55_P2093286	Apod	NM_007470	ref Mus musculus apolipoprotein D (Apod)
9,57	1,486	0,001	A_51_P100625	Apon	NM_133996	ref Mus musculus apolipoprotein N (Apon)
13,47	1,137	2,00E-05	A_55_P2035087	Arhgef15	NM_177566	ref Mus musculus Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 15 (Arhgef15)
7,26	2,133	0,00062	A_55_P2042500	BC054059	NM_145635	ref Mus musculus cDNA sequence BC054059 (BC054059)
9,92	1,623	0,00087	A_66_P105175	Bche	NM_009738	ref Mus musculus butyrylcholinesterase (Bche)
9,32	2,358	0,00034	A_55_P1981197	BI247616	BI247616	gb 602960082F1 NCI_CGAP_Li9 Mus musculus cDNA clone IMAGE:5125581 5'
15,16	2,246	1,00E-05	A_51_P110301	C3	NM_009778	ref Mus musculus complement component 3 (C3)
13,87	2,314	0,00032	A_51_P431329	Car3	NM_007606	ref Mus musculus carbonic anhydrase 3 (Car3)
10,13	1,045	0,00033	A_51_P481159	Cbr3	NM_173047	ref Mus musculus carbonyl reductase 3 (Cbr3)

10,69	1,164	0,00079	A_51_P185660	Ccl9	NM_011338	ref Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 9 (Ccl9)
7,6	1,322	3,00E-05	A_51_P291501	Ccno	NM_001081062	ref Mus musculus cyclin O (Ccno)
10,25	1,024	0,00144	A_55_P1971179	Cd1d1	NM_007639	ref Mus musculus CD1d1 antigen (Cd1d1)
9,81	1,267	4,00E-05	A_55_P1971174	Cd1d2	NM_007640	ref Mus musculus CD1d2 antigen (Cd1d2)
10,27	1,817	0,00028	A_51_P205779	Cd5l	NM_009690	ref Mus musculus CD5 antigen-like (Cd5l)
8,55	1,095	0,00023	A_51_P363947	Cdkn1a	NM_007669	ref Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a)
9,44	3,971	7,00E-05	A_51_P156955	Cfd	NM_013459	ref Mus musculus complement factor D (adipsin) (Cfd)
8,27	3,695	0	A_51_P199168	Cidea	NM_007702	ref Mus musculus cell death-inducing DNA fragmentation factor
7,34	2,311	0,00069	A_55_P1969128	Cidec	NM_178373	ref Mus musculus cell death-inducing DFFA-like effector c (Cidec)
8,23	1,654	4,00E-05	A_55_P2180744	Clstn3	NM_153508	ref Mus musculus calyntenin 3 (Clstn3)
8,63	2,531	2,00E-05	A_52_P423814	Cox8b	NM_007751	ref Mus musculus cytochrome c oxidase
7,47	1,014	0,00033	A_55_P2039210	Cpt1b	NM_009948	ref Mus musculus carnitine palmitoyltransferase 1b
16,09	1,194	1,00E-05	A_55_P2097474	Creb5	NM_172728	ref Mus musculus cAMP responsive element binding protein 5 (Creb5)
10,43	1,495	5,00E-05	A_55_P1962771	Cyfp2	NM_133769	ref Mus musculus cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (Cyfp2)
8,29	7,661	0	A_51_P279693	Cyp1a1	NM_009992	ref Mus musculus cytochrome P450
9,86	3,111	1,00E-05	A_52_P595871	Cyp1a2	NM_009993	ref Mus musculus cytochrome P450
9,46	1,613	0	A_51_P255456	Cyp1b1	NM_009994	ref Mus musculus cytochrome P450
10,96	1,653	0,00152	A_55_P2044653	Cyp2b10	NM_009999	ref Mus musculus cytochrome P450
10,22	1,303	0,0013	A_52_P289091	Cyp2b13	NM_007813	ref Mus musculus cytochrome P450
8,51	1,346	0,00032	A_52_P256914	Cyp2b9	NM_010000	ref Mus musculus cytochrome P450
11,81	1,841	0,00173	A_55_P2020477	Cyp2c50	NM_134144	ref Mus musculus cytochrome P450
11,86	1,845	0,00051	A_55_P2037912	Cyp2d10	NM_010005	ref Mus musculus cytochrome P450
9,17	1,065	0,00021	A_51_P101460	Dsp	NM_023842	ref Mus musculus desmoplakin (Dsp)
8,05	1,567	4,00E-05	A_66_P139703	ENSMUST00000097840	ENSMUST00000097840	ens Putative uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q3UXI1] [ENSMUST00000097840]
12,95	1,092	0,00124	A_55_P1999902	ENSMUST00000107229	ENSMUST00000107229	ens Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1 alpha (EC 2.7.1.68)(Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type I alpha)(PtdIns(4)P-5-kinase alpha)(PIP5K1alpha)(Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type I beta)(PI4P5K1beta)(68 kDa type I phos
9,6	1,792	8,00E-05	A_55_P2113587	ENSMUST00000107481	ENSMUST00000107481	tc MUP4_MOUSE (P11590) Major urinary protein 4 precursor (MUP 4)
13,06	1,07	0,00031	A_51_P238183	Etnk2	NM_175443	ref Mus musculus ethanolamine kinase 2 (Etnk2)
11,87	1,375	9,00E-04	A_51_P174961	F10	NM_007972	ref Mus musculus coagulation factor X (F10)
14,61	1,158	0,00169	A_51_P487818	Fabp1	NM_017399	ref Mus musculus fatty acid binding protein 1

12,27	2,092	5,00E-05	A_51_P336833	Fabp4	NM_024406	ref Mus musculus fatty acid binding protein 4
15,35	1,02	0,00134	A_55_P1997300	Fam54a	NM_027930	ref Mus musculus family with sequence similarity 54
8,82	1,266	0,00049	A_52_P100252	Fasn	NM_007988	ref Mus musculus fatty acid synthase (Fasn)
9,84	1,047	0,00028	A_55_P2123381	Fga	NM_010196	ref Mus musculus fibrinogen alpha chain (Fga)
9,94	1,132	0,00027	A_52_P294510	Fgl1	BC029734	gb Mus musculus fibrinogen-like protein 1
10,55	3,677	0	A_51_P269404	Fmo3	NM_008030	ref Mus musculus flavin containing monooxygenase 3 (Fmo3)
12,32	3,333	0	A_55_P1959595	Fmo5	NM_001161765	ref Mus musculus flavin containing monooxygenase 5 (Fmo5)
7,61	1,991	3,00E-05	A_55_P2053933	Foxa1	NM_008259	ref Mus musculus forkhead box A1 (Foxa1)
7,53	2,068	1,00E-05	A_66_P118124	Fxyd3	NM_008557	ref Mus musculus FXYD domain-containing ion transport regulator 3 (Fxyd3)
7,5	1,26	1,00E-04	A_55_P1975155	Galnt6	NM_001161767	ref Mus musculus UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (Galnt6)
14,27	1,005	0,00065	A_55_P1960936	Gm2562	XM_001473982	ref PREDICTED: Mus musculus similar to Ubtf protein (LOC100040033)
13,33	1,113	0,00048	A_55_P2140212	Gm2627	XM_001474216	ref PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein (LOC100040148)
12,09	1,101	0,00023	A_55_P2088720	Gm3651	XM_001477698	ref PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein (LOC100042075)
12,94	1,072	0,00025	A_55_P1957213	Gm4148	XM_001479389	ref PREDICTED: Mus musculus similar to gag protein (LOC100042984)
16,04	1,012	3,00E-05	A_55_P2142116	Gm4516	XM_001480212	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100043557 (LOC100043557)
9,16	1,495	0,00093	A_52_P282905	Gm5158	NM_001081372	ref Mus musculus predicted gene 5158 (Gm5158)
9,39	2,646	0,00168	A_55_P1952507	Gm5584	NM_001101534	ref Mus musculus predicted gene 5584 (Gm5584)
8,19	1,701	3,00E-05	A_52_P69558	Gm8221	XM_001475933	ref PREDICTED: Mus musculus apolipoprotein L
8,43	1,855	0,00016	A_55_P2004099	Gm9933	XM_001477458	ref PREDICTED: Mus musculus predicted gene
11,38	1,529	0,00075	A_51_P290626	Gulo	NM_178747	ref Mus musculus gulonolactone (L-) oxidase (Gulo)
14,2	1,267	0	A_66_P128918	Hac11	NM_019975	ref Mus musculus 2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 (Hac11)
15,47	1,168	0,00085	A_55_P1962303	Hba-a1	NM_008218	ref Mus musculus hemoglobin alpha
16,62	1,045	0,00079	A_55_P1962299	Hba-a2	NM_001083955	ref Mus musculus hemoglobin alpha
12,96	1,034	0,00018	A_55_P2038540	Hbb-b2	NM_016956	ref Mus musculus hemoglobin
13,4	2,083	0,00097	A_55_P2048607	Hp	NM_017370	ref Mus musculus haptoglobin (Hp)
8,67	1,062	3,00E-04	A_51_P286488	Ier3	NM_133662	ref Mus musculus immediate early response 3 (Ier3)

12,7	1,943	0,00155	A_52_P90363	Ifi2712a	NM_029803	ref Mus musculus interferon
11,06	2,519	0	A_66_P135391	Igfbp2	NM_008342	ref Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2)
7,38	2,049	0	A_52_P639402	Kcnk3	NM_010608	ref Mus musculus potassium channel
13,48	1,587	0	A_51_P324814	Krt18	NM_010664	ref Mus musculus keratin 18 (Krt18)
8,16	3,33	0	A_51_P356642	Krt19	NM_008471	ref Mus musculus keratin 19 (Krt19)
9,84	1,17	0,00035	A_51_P287198	Krt23	NM_033373	ref Mus musculus keratin 23 (Krt23)
7,26	1,821	1,00E-05	A_51_P186856	Krt5	NM_027011	ref Mus musculus keratin 5 (Krt5)
7,3	1,619	4,00E-05	A_55_P1967196	Lamb3	NM_008484	ref Mus musculus laminin
9,32	1,147	0,00015	A_55_P2120866	LOC100044171	XM_001471569	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100044171 (LOC100044171)
7,52	1,034	0,00084	A_55_P2178798	LOC100048662	XM_001480833	ref PREDICTED: Mus musculus similar to UDP glycosyltransferase 1 family polypeptide A13 (LOC100048662)
14,45	2,461	0,00111	A_55_P1974080	LOC100189605	NM_001135127	ref Mus musculus major urinary protein 17 (LOC100189605)
12,2	1,394	0,00014	A_51_P346938	Lrg1	NM_029796	ref Mus musculus leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (Lrg1)
16,32	1,103	0,00047	A_55_P1953361	Luc7l2	NM_138680	ref Mus musculus LUC7-like 2 (S. cerevisiae) (Luc7l2)
9,23	3,425	0	A_51_P343517	Ly6d	NM_010742	ref Mus musculus lymphocyte antigen 6 complex
8,15	2,007	1,00E-04	A_52_P608322	Maff	NM_010755	ref Mus musculus v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family
12,62	1,458	0	A_55_P2072453	Mosc1	NM_001081361	ref Mus musculus MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1 (Mosc1)
10,59	1,82	0,00038	A_51_P346964	Mrap	NM_029844	ref Mus musculus melanocortin 2 receptor accessory protein (Mrap)
16,21	1,003	0,00011	A_55_P2135980	Ms4a4c	NM_029499	ref Mus musculus membrane-spanning 4-domains
7,9	2,081	2,00E-05	A_51_P146560	Msln	NM_018857	ref Mus musculus mesothelin (Msln)
8,74	1,385	0,00051	A_51_P211506	Muc20	NM_146071	ref Mus musculus mucin 20 (Muc20)
12,68	2,157	7,00E-04	A_55_P2010093	Mup4	NM_008648	ref Mus musculus major urinary protein 4 (Mup4)
13,16	2,538	0,0017	A_55_P1979904	Mup9	NM_001126319	ref Mus musculus major urinary protein 9 (Mup9)
8,01	1,084	0,00012	A_55_P2058646	Nhlh1	NM_010916	ref Mus musculus nescient helix loop helix 1 (Nhlh1)
10,4	1,295	0,00037	A_51_P424338	Nqo1	NM_008706	ref Mus musculus NAD(P)H dehydrogenase
9,36	1,376	0,00027	A_55_P2035824	Nr1i3	NM_009803	ref Mus musculus nuclear receptor subfamily 1
8,41	1,64	2,00E-05	A_55_P2185905	Nrg4	NM_032002	ref Mus musculus neuregulin 4 (Nrg4)
10,79	2,295	6,00E-05	A_51_P336325	Orm1	NM_008768	ref Mus musculus orosomuroid 1 (Orm1)
10,61	2,124	0,00027	A_51_P141546	Orm2	NM_011016	ref Mus musculus orosomuroid 2 (Orm2)
8,98	1,844	0	A_51_P126563	Otc	NM_008769	ref Mus musculus ornithine transcarbamylase (Otc)

10,24	1,785	1,00E-05	A_51_P350453	Pdk4	NM_013743	ref Mus musculus pyruvate dehydrogenase kinase
8,57	1,363	0,00021	A_51_P441426	Pf4	NM_019932	ref Mus musculus platelet factor 4 (Pf4)
11,33	1,083	0,0014	A_51_P375201	Plk3	NM_013807	ref Mus musculus polo-like kinase 3 (Drosophila) (Plk3)
11,12	2,97	0,00051	A_51_P108659	Pon1	NM_011134	ref Mus musculus paraoxonase 1 (Pon1)
9,72	1,458	7,00E-05	A_51_P106799	Pparg	NM_011146	ref Mus musculus peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)
8,57	2,207	1,00E-05	A_55_P2055087	Prkar2b	NM_011158	ref Mus musculus protein kinase
13,63	2,712	0,00051	A_55_P2006118	Rbp4	NM_001159487	ref Mus musculus retinol binding protein 4
7,97	1,986	0,00083	A_55_P2428514	Retn	ENSMUST00000012849	ens Resistin Precursor (Cysteine-rich secreted protein FIZZ3)(Adipose tissue-specific secretory factor)(ADSF)(Adipose-specific cysteine-rich secreted protein A12-alpha) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99P87] [ENSMUST00000012849]
7,8	2,479	0,00103	A_55_P1984806	Retn	NM_022984	ref Mus musculus resistin (Retn)
11,1	2,157	0,00014	A_51_P281089	S100a6	NM_011313	ref Mus musculus S100 calcium binding protein A6 (calcyclin) (S100a6)
14,98	1,067	0,00011	A_52_P682382	Scd1	NM_009127	ref Mus musculus stearyl-Coenzyme A desaturase 1 (Scd1)
15,96	1,051	9,00E-05	A_55_P1953866	Sema4c	NM_001126047	ref Mus musculus sema domain
9,95	1,56	0,00115	A_51_P157112	Serpina3c	NM_008458	ref Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor
11,7	2,072	0,00013	A_51_P133562	Serpina6	NM_007618	ref Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor
14,17	1,008	4,00E-05	A_55_P2027012	Serpinc8	NM_011459	ref Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor
13,1	1,617	0,00117	A_52_P409746	Serpinc1	NM_080844	ref Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor
8	1,119	0,00074	A_66_P113490	Sh2b2	NM_018825	ref Mus musculus SH2B adaptor protein 2 (Sh2b2)
10,63	1,603	1,00E-05	A_51_P103222	Slc39a4	NM_028064	ref Mus musculus solute carrier family 39 (zinc transporter)
7,89	1,026	0,00137	A_55_P1989653	Slco4a1	NM_148933	ref Mus musculus solute carrier organic anion transporter family
9,22	1,719	0,00179	A_52_P472324	Slpi	NM_011414	ref Mus musculus secretory leukocyte peptidase inhibitor (Slpi)
16,47	1,088	4,00E-05	A_55_P2066792	Sp110	NM_175397	ref Mus musculus Sp110 nuclear body protein (Sp110)
16,25	1,107	4,00E-05	A_55_P2102365	Spag7	NM_172561	ref Mus musculus sperm associated antigen 7 (Spag7)
7,97	3,145	0	A_51_P139678	Sprr1a	NM_009264	ref Mus musculus small proline-rich protein 1A (Sprr1a)
10,36	1,273	0,00052	A_55_P1963724	TC1733495	TC1733495	tc 0610238A amylase. {Rattus norvegicus} (exp=-1; wgp=0; cg=0)
10,12	1,028	0,0015	A_52_P404341	Tdo2	NM_019911	ref Mus musculus tryptophan 2
13,31	2,22	1,00E-05	A_55_P2018666	Thrsp	NM_009381	ref Mus musculus thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus) (Thrsp)
7,65	1,712	0	A_55_P2178578	Tmprss4	NM_145403	ref Mus musculus transmembrane protease
14,73	1,642	5,00E-05	A_55_P2037585	Trf	NM_133977	ref Mus musculus transferrin (Trf)

14,01	1,273	0,00096	A_65_P19832	Ttr	NM_013697	ref Mus musculus transthyretin (Ttr)
7,21	1,007	0,00031	A_52_P338066	Ubd	NM_023137	ref Mus musculus ubiquitin D (Ubd)
16,34	1,026	4,00E-04	A_55_P1992680	Ubtf	NM_011551	ref Mus musculus upstream binding transcription factor
7,6	3,651	0,00012	A_51_P426353	Ucp1	NM_009463	ref Mus musculus uncoupling protein 1 (mitochondrial
8,01	1,463	5,00E-05	A_51_P163578	Ugt2b35	NM_172881	ref Mus musculus UDP glucuronosyltransferase 2 family
7,16	2,45	0,00033	A_52_P326664	Unc93a	NM_199252	ref Mus musculus unc-93 homolog A (C. elegans) (Unc93a)
9,15	3,716	0	A_55_P2156425	Upk1a	NM_026815	ref Mus musculus uroplakin 1A (Upk1a)
10,22	1,459	3,00E-05	A_52_P259817	Upp2	NM_029692	ref Mus musculus uridine phosphorylase 2 (Upp2)
7,22	2,386	0	A_55_P2083879	Vsig2	NM_020518	ref Mus musculus V-set and immunoglobulin domain containing 2 (Vsig2)
12,23	2,378	7,00E-04	A_51_P109840	Vtn	NM_011707	ref Mus musculus vitronectin (Vtn)
8,58	1,111	0,00131	A_51_P103397	Vwf	NM_011708	ref Mus musculus Von Willebrand factor homolog (Vwf)
14,07	1,106	5,00E-05	A_55_P1973352	XM_001476722	XM_001476722	ref PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100041156 (LOC100041156)
8,87	1,044	0,00111	A_55_P2153122	Zap70	NM_009539	ref Mus musculus zeta-chain (TCR) associated protein kinase (Zap70)
8,8	1,207	1,00E-05	A_55_P2097518	Zdhhc22	NM_001080943	ref Mus musculus zinc finger

Tabelle 81: Alle signifikant herunterregulierten Gene in den Nieren TCDD-behandelter AhR-Wildtyp-Mäuse; Cut-Off Kriterien: $A \geq 7$, $\log_2 fc \leq -1$, p-Wert ≤ 0.05

A	Log2 fc	p-value	Probe name	Gene name	Systematic name	Gene description
8,72	-1,487	2,00E-05	A_55_P2060642	2310008H04Rik	NM_146068	ref Mus musculus RIKEN cDNA 2310008H04 gene (2310008H04Rik)
10,61	-1,132	0,0011	A_55_P2163098	Akr1c18	NM_134066	ref Mus musculus aldo-keto reductase family 1
13,91	-1,136	9,00E-05	A_55_P2105180	Bhmt	NM_016668	ref Mus musculus betaine-homocysteine methyltransferase (Bhmt)
10,06	-1,378	0,00089	A_55_P2005005	Cdk5rap1	NM_025876	ref Mus musculus CDK5 regulatory subunit associated protein 1 (Cdk5rap1)
7,68	-1,114	4,00E-05	A_51_P509997	Cox6a2	NM_009943	ref Mus musculus cytochrome c oxidase
12,93	-1,01	0,00186	A_55_P2029902	Gab3	NM_181584	ref Mus musculus growth factor receptor bound protein 2-associated protein 3 (Gab3)
14,38	-1,004	0,00128	A_55_P2171788	Gm2598	XM_001474084	ref PREDICTED: Mus musculus similar to Ubtf protein (LOC100040097)
7,88	-1,042	0,00045	A_55_P2063508	Gm4131	XM_001479179	ref PREDICTED: Mus musculus similar to hCG28707 (LOC100042960)
8,57	-1,076	0,00013	A_51_P282523	Gpr124	NM_054044	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 124 (Gpr124)
8,84	-1,889	1,00E-05	A_51_P254656	Hdc	NM_008230	ref Mus musculus histidine decarboxylase (Hdc)
9,14	-1,098	0,00033	A_52_P253179	Igfbp3	NM_008343	ref Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3)

8,41	-1,049	0,00138	A_51_P309920	Itga8	NM_001001309	ref Mus musculus integrin alpha 8 (Itga8)
8,52	-1,421	3,00E-05	A_55_P2014416	LOC100044656	XM_001472652	ref PREDICTED: Mus musculus similar to renin 2 tandem duplication of Ren1
8,02	-1,194	0,00011	A_52_P236448	Ngfr	NM_033217	ref Mus musculus nerve growth factor receptor (TNFR superfamily)
9,83	-1,033	0,00025	A_55_P2114437	Pvalb	NM_013645	ref Mus musculus parvalbumin (Pvalb)
9,91	-2,013	5,00E-05	A_55_P1959091	Ren2	NM_031193	ref Mus musculus renin 2 tandem duplication of Ren1 (Ren2)
9,4	-1,662	0,00047	A_51_P263302	Rnf24	NM_178607	ref Mus musculus ring finger protein 24 (Rnf24)
10,46	-1,09	2,00E-05	A_51_P221031	Slc16a12	NM_172838	ref Mus musculus solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)
9,36	-1,37	0,00088	A_55_P1992834	Socs2	NM_007706	ref Mus musculus suppressor of cytokine signaling 2 (Socs2)
8,57	-2,206	0	A_55_P2092730	Wdfy1	NM_001111279	ref Mus musculus WD repeat and FYVE domain containing 1 (Wdfy1)

7.2 Metabolomics

Tabelle 82: Liste aller detektierten m/z-Verhältnisse mit Integral und Standardabweichung in den Mäusen; n = 3;

m/z-Verhältnis / Retentionszeit	AhR-Wildtyp-Kontrolle	Standardabweichung	AhR-Wildtyp TCDD-behandelt	Standardabweichung	AhR-defizient Kontrolle	Standardabweichung	AhR-defizient TCDD-behandelt	Standardabweichung
76.9/4.2	5,42E+06	2,34E+06	5,21E+06	1,90E+06	3,71E+06	3,72E+06	2,48E+06	1,35E+06
80/51.8	5,49E+06	1,37E+06	4,79E+06	2,82E+05	5,38E+06	5,61E+05	5,41E+06	1,42E+06
82.1/4.2	8,10E+06	6,88E+06	1,03E+07	4,64E+06	1,05E+07	5,83E+06	1,68E+07	7,60E+06
87.1/50	3,45E+07	7,59E+06	1,79E+07	2,11E+06	3,09E+07	8,73E+05	2,70E+07	1,60E+07
96/4.2	2,84E+06	2,01E+06	4,67E+06	1,79E+06	4,14E+06	2,16E+06	1,07E+07	4,96E+06
105.2/4.2	2,66E+06	2,14E+06	5,91E+06	5,86E+06	9,37E+06	6,51E+06	2,12E+07	9,05E+06
105.2/50	8,26E+07	3,96E+07	6,75E+07	3,64E+06	7,92E+07	3,31E+07	8,58E+07	2,98E+07
Betain/4.8	3,25E+06	1,55E+06	2,11E+06	5,38E+05	2,33E+06	8,32E+05	1,48E+06	1,01E+06
119.1/49.9	3,54E+07	2,87E+06	1,77E+07	2,79E+06	3,18E+07	2,63E+06	2,97E+07	2,10E+07
Leucin/8.8	2,15E+07	1,54E+07	1,80E+07	2,68E+06	1,76E+07	1,25E+06	2,17E+07	2,12E+06
138.2/19.7	1,29E+08	1,12E+07	1,12E+08	1,12E+07	1,22E+08	1,84E+07	1,05E+08	5,54E+06
158.9/4.2	2,93E+06	1,86E+06	2,15E+06	3,11E+05	2,00E+06	8,40E+05	1,83E+06	4,16E+05
Phenylalanin/12.3	4,69E+07	6,25E+06	4,72E+07	5,18E+06	4,27E+07	4,08E+06	3,55E+07	1,91E+06
170.4/19.6	6,70E+06	1,90E+06	8,76E+06	3,54E+06	3,38E+06	2,03E+06	6,04E+06	4,80E+06
Arginin/4.5	2,16E+06	8,09E+05	2,06E+06	3,07E+05	1,88E+06	8,11E+05	1,99E+06	8,51E+05
177.1/4.2	2,59E+06	1,43E+06	2,61E+06	3,91E+05	1,90E+06	8,77E+05	1,91E+06	5,95E+05
Serotonin/12	1,67E+06	6,98E+05	3,87E+06	1,68E+06	2,05E+06	1,31E+06	1,72E+06	9,46E+05
179.3/19.7	1,61E+07	5,78E+06	1,88E+07	7,03E+06	1,45E+07	6,01E+06	1,50E+07	8,88E+06
180.3/17.2	2,59E+06	2,19E+06	8,05E+06	1,22E+07	4,28E+06	1,18E+06	2,68E+06	1,20E+06
Tyrosin/9.3	1,78E+06	1,46E+06	3,57E+06	8,76E+05	2,66E+06	1,27E+06	1,91E+06	9,97E+04
191.2/33.2	4,14E+06	3,37E+06	3,05E+06	6,86E+05	1,79E+06	2,29E+05	2,19E+07	5,20E+06
194.3/18.2	2,14E+06	6,61E+05	5,61E+06	4,52E+06	2,03E+06	1,95E+06	2,76E+06	1,64E+06

200.2/4.2	9,90E+05	8,92E+05	1,30E+06	8,86E+05	1,66E+06	6,60E+05	2,77E+06	9,19E+05
203.2/4.2	2,99E+06	7,45E+05	1,21E+06	3,69E+05	1,83E+06	1,14E+06	1,92E+06	5,21E+05
Tryptophan/17.5	4,72E+07	7,31E+06	4,33E+07	9,71E+06	4,02E+07	6,94E+06	3,43E+07	6,33E+06
206.2/25.1	2,12E+06	9,77E+05	7,88E+06	1,20E+07	1,95E+06	2,36E+05	1,72E+06	9,79E+05
207.2/12.4	3,59E+06	2,64E+06	6,75E+06	2,17E+06	4,68E+06	1,24E+06	4,00E+06	1,25E+06
208.3/33.2	9,94E+05	5,25E+05	6,51E+05	2,18E+05	4,92E+05	1,51E+05	4,40E+06	5,89E+05
213.2/50.1	7,80E+06	1,13E+06	2,59E+06	1,01E+05	7,35E+06	7,47E+05	4,86E+06	4,18E+06
213.3/33.2	3,73E+06	2,18E+06	2,67E+06	4,84E+05	2,01E+06	2,70E+04	1,41E+07	3,78E+06
227.3/31	5,72E+06	6,46E+05	6,39E+06	3,69E+06	7,33E+06	6,67E+05	5,96E+06	2,70E+06
233.4/51.8	8,50E+07	4,29E+07	8,76E+07	3,91E+06	8,17E+07	1,82E+07	1,05E+08	2,45E+07
236.2/4.2	6,14E+06	4,21E+06	4,43E+06	5,94E+05	4,79E+06	2,11E+06	4,80E+06	1,04E+06
243.4/20.1	9,86E+06	1,77E+06	4,35E+06	1,53E+06	9,96E+06	2,70E+05	1,32E+07	1,70E+06
243.3/18.6	3,98E+06	2,00E+06	1,42E+06	2,98E+05	4,93E+06	5,43E+05	6,23E+06	3,13E+05
244.4/36.2	2,37E+06	6,09E+05	2,21E+06	2,55E+05	2,33E+06	2,89E+05	2,41E+06	5,68E+05
249.3/50.1	1,12E+07	2,48E+06	7,94E+06	2,78E+05	1,16E+07	1,52E+06	1,12E+07	5,14E+06
259.4/31	4,45E+06	4,52E+05	4,76E+06	1,82E+06	4,33E+06	2,31E+05	4,53E+06	6,31E+05
269.2/42.7	6,18E+06	1,07E+06	6,58E+06	3,58E+05	6,79E+06	4,82E+05	7,41E+06	1,39E+06
271.2/36.4	4,53E+06	1,55E+06	5,62E+06	1,06E+06	4,26E+06	6,41E+05	3,91E+06	7,76E+05
273.4/44.6	1,11E+07	4,80E+06	9,70E+06	2,89E+05	1,18E+07	1,71E+06	1,75E+07	1,21E+07
279.4/42.8	7,22E+06	1,10E+06	1,10E+07	4,54E+06	7,95E+06	1,07E+06	7,93E+06	9,40E+05
281.4/50.1	2,59E+07	2,04E+06	1,97E+07	4,82E+06	2,50E+07	3,23E+06	2,04E+07	9,95E+06
285.2/36.1	3,49E+06	4,05E+05	3,40E+06	4,49E+05	3,44E+06	5,39E+05	3,68E+06	5,41E+05
288.3/43.1	1,67E+06	3,35E+05	2,37E+06	6,48E+05	1,65E+06	9,60E+04	1,72E+06	3,86E+05
295.5/44.5	4,36E+06	7,10E+05	3,63E+06	7,94E+05	5,15E+06	1,55E+06	5,53E+06	3,42E+06
301.3/42.9	3,04E+06	3,67E+05	4,36E+06	1,11E+06	3,41E+06	5,45E+05	3,95E+06	1,02E+06
308.4/19.5	1,74E+06	7,88E+04	1,41E+06	7,53E+05	1,03E+06	4,67E+05	7,89E+05	3,33E+05
315.5/48.1	8,86E+06	7,50E+06	4,31E+06	6,72E+05	8,16E+06	3,28E+06	1,77E+07	2,26E+07
338.5/42.9	1,95E+06	4,75E+05	4,06E+06	1,61E+06	2,39E+06	3,88E+05	2,89E+06	4,96E+05
341.6/48.7	3,26E+06	5,76E+05	2,98E+06	1,48E+06	3,17E+06	5,09E+05	3,39E+06	8,64E+05
347.5/35.2	2,58E+06	1,70E+05	1,78E+06	2,22E+05	2,26E+06	3,77E+05	2,84E+06	1,02E+06
351.2/19.7	5,70E+06	2,35E+05	5,20E+06	3,48E+05	6,11E+06	4,44E+05	5,41E+06	5,64E+05
353.1/50.1	7,44E+06	1,16E+06	6,19E+06	1,07E+05	7,83E+06	9,25E+05	7,77E+06	2,68E+06

355.5/48.5	6,94E+06	1,04E+06	9,98E+06	1,87E+06	6,87E+06	9,10E+05	9,21E+06	8,36E+05
379.5/12	4,68E+06	1,27E+06	3,05E+06	1,49E+06	5,41E+06	6,31E+05	2,81E+06	1,89E+06
380.4/20.1	3,36E+06	7,26E+05	7,62E+05	2,28E+05	3,24E+06	6,35E+05	2,33E+06	4,87E+05
385.3/31	3,04E+06	7,68E+05	4,74E+06	8,74E+05	2,93E+06	3,49E+05	3,17E+06	5,12E+05
385.4/48.6	5,23E+06	8,00E+05	6,30E+06	3,33E+06	5,55E+06	5,21E+05	6,45E+06	1,44E+06
dCDP/36	3,74E+07	5,01E+06	3,39E+07	5,56E+06	3,48E+07	2,42E+06	4,13E+07	1,50E+07
391.5/45.7	8,28E+06	1,19E+06	7,61E+06	1,02E+06	8,28E+06	3,75E+05	9,59E+06	4,79E+06
393.8/45.2	3,62E+06	8,56E+05	4,24E+06	9,68E+05	2,60E+06	2,47E+05	2,66E+06	7,22E+05
403.6/33.3	1,27E+06	9,39E+04	7,99E+05	2,06E+05	1,02E+06	7,65E+04	3,89E+06	1,18E+06
CDP/36.1	5,85E+06	1,31E+06	5,63E+06	2,32E+06	5,91E+06	9,45E+05	8,57E+06	3,60E+06
407.5/38.8	3,98E+06	2,72E+06	4,10E+06	1,63E+06	2,01E+06	1,81E+05	1,62E+06	1,06E+06
409.5/36.1	9,28E+06	2,07E+06	8,73E+06	4,39E+05	8,80E+06	9,10E+05	1,03E+07	2,78E+06
409.5/16.9	4,57E+06	8,99E+05	2,90E+06	2,57E+06	3,30E+06	1,68E+06	2,11E+06	1,31E+06
409.5/42.6	2,71E+06	9,56E+05	3,55E+06	2,88E+05	1,93E+06	2,56E+05	1,87E+06	5,91E+05
418.4/17.1	2,77E+06	1,86E+05	1,59E+06	1,11E+06	2,96E+06	4,53E+05	1,12E+06	8,84E+05
425.7/45.3	4,32E+06	1,84E+06	5,08E+06	1,23E+06	2,96E+06	4,04E+05	2,86E+06	9,08E+05
426.7/42.7	1,78E+06	6,43E+05	3,63E+06	1,65E+06	1,13E+06	1,44E+05	1,17E+06	3,48E+05
429.5/48.6	5,00E+06	9,56E+05	6,45E+06	3,64E+06	4,77E+06	3,02E+05	6,28E+06	1,38E+06
431.4/42.7	3,59E+06	1,22E+06	6,51E+06	1,26E+06	2,35E+06	1,59E+05	3,74E+06	1,30E+06
439.5/38.7	2,42E+06	1,71E+06	2,89E+06	1,32E+06	1,15E+06	1,31E+05	1,01E+06	5,71E+05
441.6/42.6	1,57E+07	2,09E+07	3,43E+07	3,29E+06	1,77E+06	2,53E+05	1,89E+06	6,77E+05
446.6/36.1	3,34E+06	9,37E+05	4,66E+06	5,65E+05	3,10E+06	6,55E+05	4,46E+06	4,03E+05
453.6/31	1,38E+07	4,52E+06	1,50E+07	7,72E+06	1,37E+07	2,47E+06	1,50E+07	2,98E+06
454.6/45.6	5,99E+06	1,27E+05	3,06E+06	2,24E+06	4,02E+06	2,20E+06	1,87E+06	4,78E+05
463.5/46.5	3,55E+06	9,05E+05	4,10E+06	8,76E+05	3,91E+06	5,08E+05	5,39E+06	9,41E+05
473.7/48.6	4,31E+06	7,00E+05	5,17E+06	3,15E+06	4,02E+06	1,77E+05	5,26E+06	1,67E+06
478.5/47.8	2,26E+06	1,67E+05	2,11E+06	2,97E+05	2,85E+06	7,51E+05	1,80E+06	1,11E+06
485.6/20.3	5,85E+05	2,61E+05	2,82E+05	1,30E+05	1,64E+06	1,14E+05	2,67E+06	2,01E+05
489.6/36	4,05E+06	5,79E+05	2,83E+06	5,93E+05	3,22E+06	3,00E+05	4,06E+06	2,01E+06

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Thomas Michael Seibel

Promotion

02/2011 bis 10/2014 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern im Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie
Thema: „Metabolitenmuster im Blut und Genexpressionsmuster von Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-defizienten- und Wildtyp-Mäusen“

Posterbeiträge

79. Jahrestagung der DGPT März 2013 in Halle
Seibel, Thomas M.; Lohr, Christiane; Andresen, Karsten;
Schrenk, Dieter „AHR-independent gene regulation by TCDD in mouse liver and kidney“

52nd Annual Meeting Society of Toxicology (SOT)
März 2013 in San Antonio
Seibel, Thomas M.; Lohr, Christiane; Andresen, Karsten;
Schrenk, Dieter „AHR-independent gene regulation by TCDD in mouse liver and kidney“

Studium und Ausbildung

10/2005 - 10/2010 Diplom Chemie an der Technischen Universität Kaiserslautern

- Diplomarbeit: Protektive Effekte von Wirkstoffen und endogenen Metaboliten auf die Zytotoxizität von Nodularin in primären Rattenhepatozyten bei Postinkubation
- Forschungsarbeit: Die Wirkung von Resveratrol und Metformin auf die Bildung der Proteine HIF-1 α und PAI-1 und ihrer Expression in Hepatomzellen

08/1995 - 03/2004 Immanuel-Kant-Gymnasium Pirmasens

Weiterbildungen

Teilnahme am Weiterbildungsprogramm „Fachtoxikologe/ in DGPT“ (in der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie)

- Lebensmitteltoxikologie
- Organtoxikologie I und II
- Fremdstoffmetabolismus
- Molekulare Zelltoxikologie
- Versuchstierkunde I und Biostatistik
- Versuchstierkunde II

Zusätzliches

Sprachen

Deutsch: Muttersprache
Englisch: gute Kenntnisse

EDV

Sehr gute Kenntnisse in MS Excel, MS PowerPoint, MS Word, Origin, GraphPad InStat und GIMP

Mitgliedschaft

Deutsche Gesellschaft für Toxikologie (GT) e.V. (seit 2014)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation

Metabolitenmuster im Blut und Genexpressionsmuster von Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-defizienten- und Wildtyp-Mäusen

eigenständig angefertigt habe und die für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar kenntlich gemacht habe. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt.

Trippstadt, den 22.09.2014

(Thomas Seibel)